

Karakterizacija biološke aktivnosti i formuliranje inkapsuliranih sustava feniletanoidnih glikozida trave ive (*Teucrium montanum* L.)

Mandura Jarić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:343019>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ana Mandura Jarić

**KARAKTERIZACIJA BIOLOŠKE
AKTIVNOSTI I FORMULIRANJE
INKAPSULIRANIH SUSTAVA
FENILETANOIDNIH GLIKOZIDA TRAVE
IVE (*Teucrium montanum* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ana Mandura Jarić

**KARAKTERIZACIJA BIOLOŠKE
AKTIVNOSTI I FORMULIRANJE
INKAPSULIRANIH SUSTAVA
FENILETANOIDNIH GLIKOZIDA TRAVE
IVE (*Teucrium montanum* L.)**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ana Mandura Jarić

**CHARACTERISATION OF THE
BIOLOGICAL ACTIVITY AND
FORMULATION OF ENCAPSULATED
SYSTEMS OF PHENYLETHANOID
GLYCOSIDES FROM MOUNTAIN
GERMANDER (*Teucrium montanum* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Draženka Komes, Full Professor

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 582.943:620.193.8:663.952.031.1:664.148(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KARAKTERIZACIJA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI I FORMULIRANJE INKAPSULIRANIH SUSTAVA FENILETANOIDNIH GLIKOZIDA TRAVE IVE (*Teucrium montanum* L.)

Ana Mandura Jarić, mag. ing. techn. aliment.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr. sc. Draženka Komes, redovita profesorica u trajnom zvanju

Sažetak: U radu je provedena valorizacija polifenolnog ekstrakta trave ive (*Teucrium montanum* L.) karakterizacijom biološke aktivnosti i formuliranjem inkapsuliranih dozirnih sustava, inkorporiranih u formulacije funkcionalnih bombonskih proizvoda. U tu svrhu, implementirane su ekstrakcijske i inkapsulacijske tehnike te biološki test sustavi uz odgovarajuću analitičku metodologiju. U ekstraktima trave ive u najvećim udjelima identificirani su ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid. *In vitro* ispitivanjima na CAL27, AGS, Caco-2 i HepG2 staničnim linijama (0,025, 0,050, 0,150 i 0,500 mg ekstrakta mL⁻¹), utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$), o koncentraciji ovisan antioksidacijski učinak, kao i genoprotektivni učinak koncentracije 0,500 mg mL⁻¹ na modelnom DNK plazmidu ($p < 0,05$). Na *in vivo* modelu, utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$) antioksidacijski učinak na stanice jetre, odnosno genoprotektivni učinak na stanice krvi pri svim koncentracijama ekstrakta (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹). Inkapsulati formulirani sušenjem raspršivanjem na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze te nanovlakna dobivena elektroispredanjem na bazi pululana, hidroliziranog kolagena, zeina i proteina konoplje, rezultirali su inkapsulacijskom učinkovitosti feniletanoidnih glikozida većom od 72 %, dok je dodatak karboksimetil celuloze, zeina i proteina konoplje usporio kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva u *in vitro* simuliranim uvjetima probave. Inkorporacijom inkapsulata, razvijeno je pet formulacija inovativnih veganskih žele proizvoda visoko obogaćenih feniletanoidnim glikozidima iz ekstrakta trave ive (Σ 1,2 mg g⁻¹) te poželjnih senzorskih i teksturalnih karakteristika.

Broj stranica: 344

Broj slika: 71

Broj tablica: 53

Broj literaturnih navoda: 729

Broj priloga: 32

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biološko djelovanje, elektroispredanje, feniletanoidni glikozidi, funkcionalni bomboni, sušenje raspršivanjem

Datum obrane: 25. srpnja 2024.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Ksenija Durgo, redovita profesorica u trajnom zvanju
2. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin, docentica
3. dr. sc. Marin Roje, znanstveni savjetnik

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 582.943:620.193.8:663.952.031.1:664.148(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Food Technology

CHARACTERISATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY AND FORMULATION OF ENCAPSULATED SYSTEMS OF PHENYLETHANOID GLYCOSIDES FROM MOUNTAIN GERMANDER (*Teucrium montanum* L.)

Ana Mandura Jarić, MSc

Thesis performed at University of Zagreb at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb at Faculty of Science, Institute for Medical Research and Occupational Health and Faculty of Food Technology at University of Josip Juraj Strossmayer University in Osijek

Supervisor: PhD Draženka Komes, Full Professor

Short abstract: In this study, the valorization of mountain germander (MG) polyphenolic extract (*Teucrium montanum* L.) was carried out through the characterisation of biological activity and delivery systems formulation for the incorporation into functional jellies. For this purpose, extraction, encapsulation techniques and biological test systems, with appropriate analytical methodology, were used. Echinacoside, teuplioside, stachyoside A, poliumoside and verbascoside were identified in the highest yields. *In vitro* analysis on CAL27, AGS, Caco-2 and HepG2 cell lines (0.025, 0.050, 0.150 and 0.500 mg extract mL⁻¹) revealed a statistically significant ($p < 0.05$), concentration-dependent antioxidant effect, as well as genoprotective effect on DNA plasmid (0.500 mg mL⁻¹). In the *in vivo* model, a statistically significant ($p < 0.05$) antioxidant effect on the liver and genoprotective effect on blood was observed for all extract concentrations (250, 500 and 1000 mg kg⁻¹). Spray-dried particles based on gum arabic, partially hydrolysed guar gum and carboxymethyl cellulose (CMC), and electrospun nanofibers based on pullulan, hydrolysed collagen, zein (ZE) and hemp protein (HP), exhibited encapsulation efficiency of the phenylethanoid glycosides (PGs) over 72 %, while the addition of CMC, ZE and HP enabled sustained polyphenolic release kinetics under *in vitro* conditions. Incorporation of delivery system resulted in five innovative vegan jellies formulations, enriched with PGs from MG extract (Σ 1.2 mg g⁻¹) with desirable sensory and textural properties.

Number of pages: 344

Number of figures: 71

Number of tables: 53

Number of references: 729

Number of supplementaries: 32

Original in: Croatian

Key words: biological activity, electrospinning, functional jellies, phenylethanoid glycosides, spray drying

Date of the thesis defense: 25 July 2024.

Reviewers:

1. PhD Ksenija Durgo, Full Professor

2. PhD Aleksandra Vojvodić Cebin, Assistant Professor

3. PhD Marin Roje, Senior Research Associate

Thesis deposited in the Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes, u sklopu projekta „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“ (IP-2019-04-5879) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Karakterizacija biološke aktivnosti i formuliranje inkapsuliranih sustava feniletanoidnih glikozida trave ive (*Teucrium montanum* L.)“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 13. srpnja 2023., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 19. prosinca 2023.

Informacije o mentorici

dr. sc. Draženka Komes, redovita profesorica u trajnom zvanju

Prof. dr. sc. Draženka Komes redovita je profesorica u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je zaposlena od 1998. godine. Doktorirala je 2003. godine, a od 2008. godine pročelnica je Laboratorija za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda. U periodu od 2021.-2023. godine bila je prodekanica za znanost i članica Vijeća biotehničkog područja, a tijekom 2021. godine i predsjednica Matičnog odbora za područje biotehničkih znanosti-polje poljoprivrede, šumarstva, drvne tehnologije, biotehnologije i prehrambene tehnologije i nutricionizma.

Sudjeluje u izvođenju nastave na 14 kolegija koji se održavaju na prijediplomskim i diplomskim studijima te na poslijediplomskom doktorskom i specijalističkom studiju, pri čemu je nositeljica 6 kolegija. Do sada su pod njezinim mentorstvom izrađena 72 diplomatska rada i 54 završna rada te je bila mentorica 2 doktorske disertacije i 4 studentska rada koji su nagrađeni Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu. Stručno se usavršavala na Julius Kühn-Institute, Quedlinburg (Njemačka) (2004. i 2008. godine), a kao gostujući nastavnik boravila je na Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Faculty of Biotechnology and Food Science (Poljska) (akad. godine 2019./2020. te 2022./2023.), na University of Peradeniya, Faculty of Agriculture, Peradeniya (Šri Lanka) (akad. godine 2014./2015.), na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu (akad. godine 2010./2011.) te na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu (akad. god 2008./2009.).

Kao rezultat znanstvenih istraživanja do sada je objavila 10 poglavlja u knjigama i 170 izvorna znanstvena rada, od čega je 115 znanstvenih radova indeksirano u WoSCC-SCI-Exp. Prema WOS-u h-indeks joj je 31, a citiranost 3776.

Prof. dr. sc. Draženka Komes bila je voditeljica znanstvenog projekta HRZZ-a koji je završio u veljači 2024. godine, a trenutno kao suradnica sudjeluje na jednom HRZZ projektu i na jednom Erasmus+ projektu. Do sada je vodila 9 znanstvenih projekata (radni paket FP7 projekta (FP7-KBBE-2009-3), projekt MZOŠ-a te hrvatsko-srpske, hrvatsko-kineske i hrvatsko-slovenske bilateralne projekte), a kao suradnica sudjelovala je na 11 znanstvenih projekata (pet europskih i šest nacionalnih).

Godine 2008. inicirala je organizaciju nacionalnog stručnog skupa „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj” koji se do danas kontinuirano održava svake godine, a 2013. godine pokrenula je i nacionalno studentsko natjecanje „Ecotrophelia Hrvatska” i od tada je i članica Stručnog povjerenstva natjecanja „Ecotrophelia Europe“. Bila je članica Znanstvenih i Organizacijskih

odbora devet međunarodnih konferencija te je članica nekolicine stručnih društava. Na poziv Akreditacijske agencije Kosova 2022. godine bila je članicom ekspertnog tima u evaluaciji jednog studijskog programa na University of Peja "Haxhi Zeka", a 2016. godine bila je članica Stručnog povjerenstva u postupku inicijalne akreditacije za obavljanje znanstvene djelatnosti na Sveučilištu u Splitu.

Članica je brojnih radnih skupina, povjerenstava i odbora, kako na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, tako i u Ministarstvu poljoprivrede, Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti te Hrvatskom društvu prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista. Predsjednica je Tehničke komisije Hrvatske gospodarske komore za dodjelu znaka „Hrvatska kvaliteta“, u kategoriji Ostali proizvodi.

Članica je Uredničkog odbora znanstvenog časopisa Food Technology and Biotechnology, znanstveno-stručnog časopisa Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam te znanstvenog časopisa Croatian Journal of Food Science and Technology.

Dobitnica je Državne nagrade za značajno znanstveno dostignuće za područje biotehničkih znanosti (2010.), Godišnje nagrade Hrvatske akademije tehničkih znanosti (2007.) i Godišnje nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu (2013.).

SAŽETAK

Sukladno rastućoj popularizaciji tržišnog segmenta hrane biljnoga podrijetla i povećanim zahtjevima potrošača za obogaćenim funkcionalnim proizvodima, u ovom radu istraživana je mediteranska biljna vrsta trava iva (*T. montanum* L.) u kontekstu bioloških učinaka i mogućnosti valorizacije u inkapsuliranim dozirnim sustavima, odnosno na modelu konditorskog proizvoda. U tu svrhu, primijenjene su konvencionalne i inovativne ekstrakcijske tehnike, inkapsulacijske tehnike i biološki test sustavi uz odgovarajuću preparativnu i analitičku metodologiju. Određen je kemijski sastav uzoraka trave ive prikupljenih sa šest lokaliteta, te su optimirani uvjeti konvencionalne ekstrakcije zagrijavanjem, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ekstrakcije subkritičnom vodom. Primjenom nuklearne magnetske rezonancije i spektrometrije masa visoke rezolucije, ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid određeni su kao najzastupljeniji polifenolni spojevi (30,36 do 68,06 mg g⁻¹ s. tv.). *In vitro* ispitivanjima na CAL27, Caco-2, AGS, HepG2 staničnim linijama (0,025, 0,050, 0,150 i 0,500 mg ekstrakta mL⁻¹), utvrđen je statistički značajan (p<0,05), o koncentraciji ovisan antioksidacijski učinak, kao i genoprotektivni učinak koncentracije 0,500 mg mL⁻¹ na modelnu DNK. Na *in vivo* modelu, utvrđen je statistički značajan (p<0,05) antioksidacijski učinak na stanice jetre, odnosno genoprotektivni učinak na stanice krvi pri svim koncentracijama ekstrakta (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹). Sušenjem raspršivanjem uspješno je formulirano 13 inkapsuliranih sustava ekstrakta na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze. Elektroispredanjem, uspješno je proizvedeno 20 inkapsuliranih sustava ekstrakta u formi nanovlakana korištenjem pululana, hidroliziranog kolagena, zeina i proteina konoplje. Svi inkapsulati rezultirali su visokom inkapsulacijskom učinkovitosti feniletanoidnih glikozida (> 72 %), a ATR-FT-IR analiza rezultirala je spektrima svojstvenih apsorpcijskih vrpca za funkcionalne skupine polifenolnih spojeva i nosača. Relativno hidrofoban karakter karboksimetil celuloze, zeina i izolata proteina konoplje značajno je usporio kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz inkapsulata u *in vitro* uvjetima probave. Inkorporacijom inkapsulata, formulirano je pet receptura funkcionalnih veganskih žele proizvoda na bazi kukuruznog i kudzu škroba, visokoobogaćenih feniletanoidnim glikozidima iz ekstrakta trave ive (Σ 1,2 mg g⁻¹) te poboljšane kinetike otpuštanja polifenola iz dozirnog sustava unutar žele matriksa u odnosu na neinkapsulirani ekstrakt.

Ključne riječi: biološko djelovanje, elektroispredanje, feniletanoidni glikozidi, funkcionalni bomboni, sušenje raspršivanjem

SUMMARY

In line with the increasing popularization of the plant-based food segment and consumer demand for functional food products, this work investigated the Mediterranean plant species mountain germander (MG) (*T. montanum* L.) in terms of biological effects, and the valorization potential in encapsulated delivery systems, as well as in confectionery model. For this purpose, conventional and innovative extraction techniques, encapsulation techniques and biological test systems, with appropriate preparative and analytical methodology, were used. The chemical composition of MG samples collected from six locations was determined, and the conventional extraction, microwave-assisted extraction and subcritical water extraction conditions were optimized. Nuclear magnetic resonance and high-resolution mass spectrometry revealed echinacoside, teupolioside, stachyoside A, poliumoside and verbascoside as the most abundant polyphenolic compounds (30.36 to 68.06 mg g⁻¹ s. tv.). *In vitro* tests on cell lines CAL27, Caco-2, AGS and HepG2 (0.025, 0.050, 0.150 and 0.500 mg extract mL⁻¹) showed a statistically significant (p<0.05), concentration-dependent antioxidant effect as well as a genoprotective effect of 0.500 mg mL⁻¹ extract concentration on a DNA plasmid. In the *in vivo* model, a statistically significant (p<0.05) antioxidant effect on the liver and genoprotective effect on blood for all extract concentrations (250, 500 and 1000 mg kg⁻¹) was observed. In total, 13 delivery systems of MG extract based on gum arabic, partially hydrolysed guar gum and carboxymethyl cellulose were successfully formulated by spray-drying. Using the electrospinning technique, 20 formulations of nanofibers were successfully produced using pullulan, hydrolysed collagen, zein and hemp protein isolate. All delivery systems resulted in high encapsulation efficiency of phenylethanoid glycosides (> 72 %), and ATR-FT-IR spectra revealed characteristic absorption bands for functional groups of the polyphenolic compounds and polymer carriers. The relatively hydrophobic character of carboxymethyl cellulose, zein and hemp protein notably improved controlled release kinetics of polyphenols from delivery systems in the simulated *in vitro* digestion conditions. The incorporation of delivery systems resulted in five formulations of functional vegan jelly products, based on corn and kudzu starch, highly enriched with phenylethanoid glycosides from MG extract (Σ 1.2 mg g⁻¹), and with improved kinetics release of polyphenols from delivery system within the jelly matrix, in compare to non-encapsulated extract.

Key words: biological activity, electrospinning, functional jellies, phenylethanoid glycosides, spray drying

Veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. *Draženki Komes*, na prilici za ovo nezaboravno znanstveno putovanje, pruženim mogućnostima za usavršavanje, ukazanom povjerenju, kreativnom duhu i posvećenosti detaljima. Hvala vam na svim sugestijama i smjernicama prilikom izrade rada!

Veliko hvala prof. dr. sc. *Kseniji Durgo* na značajnom doprinosu ovom radu, bezuvjetnoj podršci i autentičnoj dobroti koju nesebično dijeli s drugima!

Veliko hvala dr. sc. *Ani Čikoš*, znanstvenoj suradnici, na neprocjenjivom doprinosu vezanom za NMR identifikaciju i priložene NMR spektre te velikodušnom dijeljenju svoga znanja.

Hvala svim članovima Povjerenstva na konstruktivnim komentarima koji su doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Danijela, neizmjereno ti hvala na svakoj riječi, djelu i podršci. Koliko smo samo izazovnih situacija zajedno proživjele i savladale - neprocjenjivo! ☺

Aleksandra, ne znam što prije spomenuti - tvoju profesionalnost, kolegijalnost ili sestrinsku podršku koju uvijek bezrezervno pružaš. Hvala ti od srca! ☺

Posebno hvala dr. sc. *Ani Huđek Turković*, prof. dr. sc. *Vesni Benković*, *Suzani Đambić*, dr. sc. *Anici Horvat Knežević*, dr. sc. *Predragu Petroviću*, mag. ing. *Sunčici Kuzmić*, prof. dr. sc. *Domagoju Vrsaljku*, prof. dr. sc. *Steli Jokić*, doc. dr. sc. *Krunoslavu Aladiću*, izv. prof. dr. sc. *Antunu Jozinoviću*, izv. prof. dr. sc. *Moniki Kovačević*, mag. ing. *Lauri Haramustek* i mag. ing. *Ivani Žepić* na svom velikom doprinosu.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama s PMF-a, IRB, FKIT-e, FBF-a i Instituta za medicinska istraživanja na ustupanju uređaja i doniranju materijala za rad, istraživačkom duhu i dobroj volji, a posebno: dr. sc. *Dyani Odeh*, mag. chem. *Marijani Pocrnić*, dr. sc. *Almi Ramić*, dr. sc. *Dariji Domazet Jurašin*, dr. sc. *Ivi Crnolatu*, dr. sc. *Ivi Piantanidi*, dr. sc. *Anđeli Buljan*, prof. dr. sc. *Krunoslavu Žižeku*, dr. sc. *Lauri Nižić Nodilo*, kao i *Branimiru Valenčaku* i *Ivanu Königu*, te svim kolegicama i kolegama s PBF-a i ostalih znanstveno-obrazovnih institucija.

Nema dovoljno niti riječi niti djela kojima bih zahvalila mom Fabijanu. Tvoja prisutnost, pozitivna energija i moć stabilizacije mojih emotivnih vrtloga bili su mi veliki vjetar u leđa.

Hvala ti što uvijek čvrsto stojiš uz mene. Ova diploma pripada i tebi!

Beskonačno hvala mojim roditeljima i sekama na svakom zagrljaju bezuvjetne podrške. Vaše moralne vrijednosti i kreativna energija oduvijek su moj podsvjesni putokaz.

Veliko hvala svekru i svekrvi na podršci i svim dragocjenim pošiljkama iz Slavonije, kao i mojim kumovima i prijateljima koji su imali strpljenja za moje anegdote o doktoratu ☺

Toliko toga sam naučila, baš sam zahvalna!

Za neiscrpnu znatiželju i nove izazove!



SADRŽAJ

| | | |
|------------|--|----|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 2. | OPĆI DIO..... | 4 |
| 2.1. | Povijesni značaj i status tradicionalnih biljnih vrsta..... | 4 |
| 2.2. | Tradicionalne biljne vrste roda <i>Teucrium</i> | 6 |
| 2.2.1. | Trava iva (<i>T. montanum</i> L.)..... | 13 |
| 2.2.1.1. | Feniletanoidni glikozidi | 21 |
| 2.2.1.1.1. | Stabilnost i biodostupnost | 25 |
| 2.2.2. | Biološka aktivnost trave ive | 27 |
| 2.3. | Valorizacija biljnih ekstrakata..... | 32 |
| 2.3.1. | Inkapsulacija | 32 |
| 2.3.1.1. | Izazovi inkapsulacije polifenola i podjela tehnika | 32 |
| 2.3.1.2. | Sušenje raspršivanjem | 34 |
| 2.3.1.3. | Elektroispredanje..... | 40 |
| 2.3.1.4. | Nosači za inkapsulaciju | 49 |
| 2.3.2. | Funkcionalna hrana | 59 |
| 2.3.2.1. | Izazovi na tržištu | 59 |
| 2.3.2.2. | Funkcionalni bombonski proizvodi..... | 62 |
| 3. | Materijali i metode..... | 71 |
| 3.1. | Materijal | 71 |
| 3.1.1. | Biljni materijal | 71 |
| 3.1.2. | Biološki test sustavi..... | 72 |
| 3.1.2.1. | Modelne makromolekule | 72 |
| 3.1.2.2. | Kontinuirane humane stanične linije | 72 |
| 3.1.2.3. | Bakterijske kulture | 72 |
| 3.1.2.4. | Hranjive podloge | 73 |
| 3.1.2.5. | Pokusne životinje | 73 |
| 3.1.3. | Sirovine korištene u proizvodnji funkcionalnih bombonskih proizvoda | 74 |
| 3.1.4. | Kemikalije | 74 |
| 3.1.5. | Uređaji i oprema | 77 |
| 3.2. | Metode..... | 80 |
| 3.2.1. | Određivanje kemijskog sastava trave ive | 80 |
| 3.2.2. | Karakterizacija polifenolnog sastava trave ive | 80 |
| 3.2.2.1. | Optimizacija uvjeta ekstrakcije polifenolnih spojeva..... | 80 |
| 3.2.2.2. | Određivanje udjela ukupnih polifenola | 81 |
| 3.2.2.3. | Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom | 81 |
| 3.2.2.4. | Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom | 82 |
| 3.2.2.5. | Identifikacija polifenolnih spojeva..... | 82 |
| 3.2.2.5.1. | Analiza spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) | 82 |
| 3.2.2.5.2. | Analiza spektrometrijom masa visoke rezolucije spregnutom s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS).. | 83 |
| 3.2.2.6. | Kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) | 84 |
| 3.2.3. | Priprema liofiliziranog ekstrakta za analizu bioloških učinaka | 85 |
| 3.2.4. | <i>In vitro</i> analize polifenolnog ekstrakta trave ive..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.4.1. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka na kontinuirane humane stanične linije | 86 |
| 3.2.4.2. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka na kontinuirane humane stanične linije | 86 |
| 3.2.4.3. Određivanje bakteriostatskog/proliferativnog učinka na predstavnike humane mikrobiote | 87 |
| 3.2.4.4. Određivanje genotoksičnog/genoprotektivnog učinka na humane kontinuirane stanične linije i modelnu DNK | 87 |
| 3.2.5. <i>In vivo</i> analize polifenolnog ekstrakta trave ive | 88 |
| 3.2.5.1. Plan eksperimenta i obrada životinja | 88 |
| 3.2.5.2. Analiza biokemijskih i hematoloških parametara krvi štakora | 89 |
| 3.2.5.3. Priprema homogenata organa za analize | 89 |
| 3.2.5.4. Određivanje udjela proteina u homogenatima tkiva | 90 |
| 3.2.5.5. Određivanje intenziteta oštećenja proteina u homogenatima tkiva | 90 |
| 3.2.5.6. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u homogenatima tkiva | 91 |
| 3.2.5.7. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa u homogenatima tkiva | 91 |
| 3.2.5.8. Određivanje učinka na parametre genotoksičnosti komet testom | 92 |
| 3.2.6. Inkapsulacija ekstrakta sušenjem raspršivanjem | 93 |
| 3.2.6.1. Priprema otopina nosača | 93 |
| 3.2.6.2. Reološka karakterizacija otopina nosača | 93 |
| 3.2.6.2.1. Određivanje krivulje viskoznosti | 94 |
| 3.2.6.2.2. Test promjene amplitude | 94 |
| 3.2.6.3. Provedba inkapsulacije sušenjem raspršivanjem | 94 |
| 3.2.6.4. Karakterizacija prahova | 95 |
| 3.2.6.4.1. Određivanje prinosa | 95 |
| 3.2.6.4.2. Određivanje suhe tvari | 95 |
| 3.2.6.4.3. Određivanje zeta potencijala, indeksa polidisperzije i veličine čestica | 95 |
| 3.2.6.4.4. Određivanje kontaktnog kuta | 95 |
| 3.2.6.4.5. Morfološka karakterizacija primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM) | 95 |
| 3.2.6.4.6. Određivanje funkcionalnih skupina ATR-FT-IR tehnikom | 96 |
| 3.2.6.4.7. Određivanje toplinskih svojstava primjenom razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC) | 96 |
| 3.2.6.4.8. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti | 96 |
| 3.2.6.4.9. Kinetika otpuštanja polifenola u <i>in vitro</i> uvjetima | 97 |
| 3.2.7. Inkapsulacija ekstrakta elektroispredanjem | 97 |
| 3.2.7.1. Priprema otopina nosača | 97 |
| 3.2.7.2. Reološka karakterizacija otopina nosača | 99 |
| 3.2.7.2.1. Određivanje krivulje viskoznosti | 99 |
| 3.2.7.2.2. Test promjene amplitude | 99 |
| 3.2.7.2.3. Test promjene frekvencije | 99 |
| 3.2.7.3. Fizikalna karakterizacija otopina nosača | 99 |
| 3.2.7.3.1. Određivanje konduktivnosti i površinske napetosti | 99 |
| 3.2.7.3.2. Određivanje gustoće | 100 |
| 3.2.7.3.3. Određivanje Ohnesorge-ovog broja | 100 |
| 3.2.7.4. Provedba inkapsulacije elektroispredanjem | 100 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.7.5. Karakterizacija nanovlakana | 101 |
| 3.2.7.5.1. Određivanje zeta potencijala | 101 |
| 3.2.7.5.2. Morfološka karakterizacija primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM)..... | 102 |
| 3.2.7.5.3. Određivanje relativne distribucije promjera nanovlakana | 102 |
| 3.2.7.5.4. Određivanje funkcionalnih skupina ATR-FT-IR tehnikom..... | 102 |
| 3.2.7.5.5. Određivanje promjena sekundarne konformacije proteina cirkularnim dikroizmom..... | 102 |
| 3.2.7.5.6. Određivanje toplinskih svojstava primjenom razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC)..... | 103 |
| 3.2.7.5.7. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti | 103 |
| 3.2.7.5.8. Kinetika otpuštanja polifenola u <i>in vitro</i> uvjetima | 103 |
| 3.2.8. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda | 104 |
| 3.2.8.1. Razvoj formulacija uz dodatak inkapsuliranog ekstrakta trave ive..... | 104 |
| 3.2.8.2. Određivanje udjela amiloze i amilopektina u škrobovima | 105 |
| 3.2.8.3. Karakterizacija funkcionalnih bombonskih proizvoda..... | 105 |
| 3.2.8.3.1. Određivanje suhe tvari | 105 |
| 3.2.8.3.2. Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida i metilksantina..... | 105 |
| 3.2.8.3.3. Određivanje teksturalnih svojstava..... | 106 |
| 3.2.8.3.4. Kinetika otpuštanja polifenola u <i>in vitro</i> uvjetima | 106 |
| 3.2.8.3.5. Senzorska analiza | 106 |
| 3.2.9. Statistička obrada podataka | 107 |
| 4. REZULTATI | 108 |
| 4.1. Kemijski sastav trave ive..... | 108 |
| 4.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata trave ive | 110 |
| 4.2.1. Optimizacija ekstrakcije polifenola konvencionalnom tehnikom..... | 110 |
| 4.2.2. Optimizacija ekstrakcije polifenola potpomognuta mikrovalovima | 115 |
| 4.2.3. Optimizacija ekstrakcije polifenola subkritičnom vodom..... | 120 |
| 4.2.4. Identifikacija polifenolnih spojeva trave ive | 125 |
| 4.2.4.1. Analiza spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) | 126 |
| 4.2.4.2. Analiza spektrometrijom masa visoke rezolucije spregnutom s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS) | 127 |
| 4.2.5. Polifenolni sastav uzoraka trave ive..... | 130 |
| 4.3. <i>In vitro</i> biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive | 133 |
| 4.3.1. Citotoksični/proliferativni učinak na kontinuirane humane stanične linije..... | 134 |
| 4.3.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak na kontinuirane humane stanične linije | 136 |
| 4.3.3. Bakteriostatski/proliferativni učinak na predstavnike humane mikrobiote..... | 138 |
| 4.3.4. Genotoksični/genoprotektivni učinak na kontinuirane humane stanične linije i modelnu DNK | 139 |
| 4.4. <i>In vivo</i> biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive | 143 |
| 4.4.1. Promjena mase štakora i pojedinih organa | 143 |
| 4.4.2. Učinak na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora | 145 |
| 4.4.3. Učinak na markere oksidacijskog stresa u stanicama tkiva jetre i bubrega | 147 |
| 4.4.4. Učinak na parametare genotoksičnosti u krvi te jetri i bubrezima | 149 |
| 4.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjem | 151 |
| 4.5.1. Reološka karakterizacija otopina nosača..... | 151 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.1.1. Rezultati viskoznosti i linearnog viskoelastičnog područja..... | 151 |
| 4.5.2. Karakterizacija inkapsulata sušenih raspršivanjem..... | 153 |
| 4.5.2.1. Fizikalni parametri inkapsulata | 153 |
| 4.5.2.2. ATR-FT-IR spektri funkcionalnih skupina nosača i inkapsulata..... | 158 |
| 4.5.2.3. Termogrami nosača i inkapsulata dobiveni razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) | 160 |
| 4.5.2.4. Bioaktivna svojstva inkapsulata | 162 |
| 4.6. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive elektroispredanjem..... | 166 |
| 4.6.1. Reološka karakterizacija otopina nosača..... | 166 |
| 4.6.2. Fizikalna karakterizacija otopina nosača..... | 170 |
| 4.6.3. Karakterizacija nanovlakana..... | 171 |
| 4.6.3.1. Fizikalni parametri inkapsulata | 171 |
| 4.6.3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nosača i inkapsulata..... | 182 |
| 4.6.3.3. Termogrami nosača i inkapsulata dobiveni razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) | 186 |
| 4.6.3.4. Bioaktivna svojstva inkapsulata | 188 |
| 4.7. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda | 192 |
| 4.7.1. Bioaktivna karakterizacija | 192 |
| 4.7.2. Teksturalna svojstva | 194 |
| 4.7.3. Kinetika otpuštanja polifenola u <i>in vitro</i> uvjetima..... | 194 |
| 4.7.4. Senzorska svojstva | 195 |
| 5. RASPRAVA..... | 197 |
| 5.1. Kemijski sastav trave ive..... | 198 |
| 5.2. Polifenolni sastav ekstrakta trave ive | 200 |
| 5.2.1. Optimizacija ekstrakcije ekstrakcije polifenola konvencionalnom tehnikom | 201 |
| 5.2.2. Optimizacija ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima | 203 |
| 5.2.3. Optimizacija ekstrakcije subkritičnom vodom | 204 |
| 5.2.4. Identifikacija polifenolnih spojeva trave ive | 206 |
| 5.2.4.1. Primjena spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) | 206 |
| 5.2.4.2. Primjena spektrometrije masa visoke rezolucije spregnute s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS) | 208 |
| 5.2.5. Polifenolni sastav uzoraka trave ive..... | 209 |
| 5.3. <i>In vitro</i> biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive | 214 |
| 5.3.1. Citotoksični/proliferativni učinak na kontinuirane humane stanične linije..... | 214 |
| 5.3.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak na kontinuirane humane stanične linije | 215 |
| 5.3.3. Bakteriostatski/proliferativni učinak na predstavnike humane mikrobiote..... | 217 |
| 5.3.4. Genotoksični/genoprotektivni učinak na kontinuirane humane stanične linije i modelnu DNK | 219 |
| 5.4. <i>In vivo</i> biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive | 221 |
| 5.4.1. Promjena mase štakora i pojedinih organa | 221 |
| 5.4.2. Učinak na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora | 222 |
| 5.4.3. Učinak na markere oksidacijskog stresa jetre i bubrega | 224 |
| 5.4.4. Učinak na parametre genotoksičnosti u krvi te jetri i bubrezima | 228 |
| 5.5. Inkapsulacija ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjem..... | 231 |
| 5.5.1. Reološka karakterizacija otopina nosača..... | 231 |
| 5.5.2. Fizikalna karakterizacija inkapsulata | 232 |

| | |
|---|-----|
| 5.5.3. ATR-FT-IR spektri funkcionalnih skupina nosača i inkapsulata | 237 |
| 5.5.4. Toplinska svojstva nosača i inkapsulata..... | 239 |
| 5.5.5. Bioaktivna svojstva inkapsulata..... | 240 |
| 5.6. Inkapsulacija ekstrakta trave ive elektroispredanjem | 242 |
| 5.6.1. Reološka karakterizacija otopina nosača..... | 242 |
| 5.6.2. Fizikalna karakterizacija otopina nosača..... | 245 |
| 5.6.3. Fizikalni parametri inkapsulata..... | 246 |
| 5.6.4. Fizikalno-kemijska karakterizacija nosača i nanovlakana | 250 |
| 5.6.5. Toplinska svojstva nosača i nanovlakana..... | 254 |
| 5.6.6. Bioaktivna svojstva nanovlakana..... | 255 |
| 5.7. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda | 256 |
| 5.7.1. Bioaktivna karakterizacija | 256 |
| 5.7.2. Teksturalna svojstva | 257 |
| 5.7.3. Kinetika otpuštanja polifenola u <i>in vitro</i> uvjetima..... | 257 |
| 5.7.4. Senzorska svojstva | 258 |
| 6. ZAKLJUČCI | 259 |
| 7. LITERATURA | 261 |
| 8. PRILOZI | 313 |

1. UVOD

Popularizacija hrane biljnoga podrijetla i povećana briga potrošača o zdravlju (prevenciji kroničnih oboljenja) značajno su utjecali na promjenu konvencionalnih pristupa globalnih proizvođača hrane u razvoju prehrambenih proizvoda u posljednjem desetljeću, otvarajući tako neograničene mogućnosti za proširenje i plasiranje koncepata prehrambenih proizvoda s dodanom vrijednošću. Postavljeni su novi standardi na globalnom tržištu prehrambene industrije, a koji bi, pored nutritivnog profila, trebali zadovoljiti dodatne zahtjeve potrošača usmjerene prema nenutritivnim, biološki aktivnim sastojcima. Među njima, posebno se ističu polifenolni spojevi koji su već dugi niz godina u fokusu znanstvene zajednice, s dokazanim pozitivnim učincima u prevenciji kroničnih oboljenja te u jačanju imunološkog sustava i usporavanja procesa starenja (Chen i sur., 2020; Eldin i sur., 2021; Zhang i sur., 2017). Premda na tržištu već postoji široki asortiman funkcionalnih proizvoda obogaćenih prehrambenim vlaknima, vitaminima i mineralnim tvarima kao nutritivno visokovrijednim sastojcima, te aromama i bojama deriviranim iz biljnih izvora, realizacija ideje o proširenju asortimana funkcionalnih proizvoda obogaćenih prirodnim izvorima polifenolnih spojeva tek je u začetku te je još uvijek limitirana u kontekstu znanstvenih istraživanja. No, uzimajući u obzir kontinuirano jačanje tržišta polifenola i biljnih pripravaka kao njihovih izvora, ovakvi proizvodi mogu ostvariti visoki komercijalni potencijal (Anonymus, 2024a).

Uz voće i povrće, aromatsko i začinsko bilje predstavlja najznačajniji prehrambeni izvor polifenolnih spojeva pri čemu su biljne vrste iz porodica Asteraceae, Fabaceae i Lamiaceae ekonomski i tradicionalno najvažnije, s dugom poviješću korištenja u ljekovite i prehrambene svrhe, a uglavnom u obliku biljnih infuzija, tinktura, balzama, ili kao prehrambeni začini. Obzirom na činjenice da je tek oko 15 % od ukupno 400 000 poznatih biljnih vrsta istraženo u ljekovite svrhe, kao i da je 25 % današnjih konvencionalnih lijekova prvotno izolirano iz biljnih izvora, do izražaja dolazi potencijal biljnih sirovina kao neograničene riznice već poznatih, ali i još neotkrivenih bioaktivnih spojeva (Yuan i sur., 2016; Patridge i sur., 2015). Među neistražene biljne vrste, spada i trava iva (*Teucrium montanum* L.) iz porodice Lamiaceae, dominantno rasprostranjena na području mediteranskog bazena i Balkanskog poluotoka. Premda joj tradicionalna primjena u ljekovite svrhe, poput liječenja gastrointestinalnih i plućnih oboljenja, bolesti jetre, jačanju imuniteta, reuma i artritisa, seže još iz antičkog doba, istraživanja vezana za bioaktivni sastav trave ive izrazito su limitirana (Šarić-Kundalić i sur., 2010a; Zlatković i sur., 2014; Jarić i sur., 2015; Menković i sur., 2011). Prema Web of Science bazi podataka (WoS), dostupno je tek osam znanstvenih radova vezanih za njenu biološku

aktivnost *in vitro*, dok je na *in vivo* modelima njezin učinak nepoznat. U sklopu revitalizacije statusa i proširenja komercijalne primjene tradicionalnih biljnih vrsti posljednjih godina, jasno se naglašava važnost utvrđivanja bioloških učinaka, sigurnih doza za njihovu konzumaciju i standardizacije proizvodnje kroz integraciju suvremenih biotehnoloških, analitičkih i IT metodologija.

Pored jasne slike o biološkim učincima istraživanih polifenola i njihovih izvora kao što su biljni ekstrakti, također je potrebno prevladati izazove vezane za kemijsku strukturu polifenola, odnosno ograničenu topljivost, sklonost oksidaciji, degradaciji pri visokim temperaturama, određenoj pH vrijednosti i svjetlu, a što uvelike uvjetuje i njihovu nisku bioraspoloživost u uvjetima probave, te u konačnici, nemogućnost maksimalnog ispoljavanja njihovih bioaktivnih svojstava u organizmu (Fang i Bhandari, 2010). U svrhu zaštite strukture i povećanja biodostupnosti polifenola, primjenjuju se različite inkapsulacijske tehnike koje omogućuju pretvorbu disperznog sustava, sastavljenog od aktivnih komponenata (u ovom kontekstu polifenola) i nosača za njihovu zaštitu, u inkapsulirani dozirni sustav jedinstvenih karakteristika, primjenom fizikalnih, kemijskih, fizikalno-kemijskih ili elektrohidrodinamičkih procesa. Tako dobiveni sustavi rezultiraju boljom stabilnošću polifenola i očuvanjem njihove kemijske strukture, a što otvara različite mogućnosti njihove daljnje valorizacije u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Sušenje raspršivanjem predstavlja najčešće korištenu inkapsulacijsku tehniku osobito prikladnu za termolabilne spojeve, a temelji se na fizikalnom transferu mase i topline pomoću konvekcijskog medija za pretvorbu tekućeg sustava nosača i aktivnih spojeva u dozirne sustave mikročestica. Uz komercijalne fizikalne i fizikalno-kemijske tehnike, u inkapsulaciji polifenola sve se više istražuje tehnika elektroispredanja kojom se, pomoću visokog napona pri uvjetima sobne temperature, mogu proizvesti inkapsulacijski dozirni sustavi u formi nanovlakana, specifičnih morfoloških i fizikalno-kemijskih svojstava. Ova tehnika svoju širu primjenu tek pronalazi u industriji polimernih materijala, biomedicini, tkivnom inženjerstvu i industriji senzora, dok je na području prehrambene industrije elektroispredanje slabo istraženo.

Gumeni i žele bomboni predstavljaju prikladan matriks za razvoj obogaćenih funkcionalnih proizvoda obzirom na neutralan hidrokolidni sustav i različite mogućnosti modifikacije senzorskih svojstava. Sukladno ekonomskim i socio-kulturološkim promjenama na globalnom tržištu u vidu uključivanja generacije Z u potrošačko društvo, snažnog jačanja segmenta "ready-to-eat" proizvoda i popularizacije autentičnih i multikulturoloških koncepata hrane, model žele bombonskog proizvoda može biti prikladan izbor za optimiranje formulacije veganskih proizvoda i, općenito, inkorporaciju biljnih dodataka.

Sukladno navedenome, ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti kemijski i bioaktivni sastav ekstrakta trave ive.
2. Definirati biološku aktivnost ekstrakta trave ive na *in vitro* modelima humanih staničnih linija te *in vivo* modelu štakora.
3. Formulirati i karakterizirati inkapsulirane sustave polifenolnog ekstrakta trave ive.
4. Implementirati inkapsulate najizraženijeg bioaktivnog potencijala i najboljih fizikalno-kemijskih karakteristika u funkcionalne bombonske proizvode.

Rezultati ovog istraživanja upotpunit će limitirane spoznaje o neistraženom polifenolnom sastavu trave ive (*T. montanum* L.). Karakterizacijom biološke aktivnosti ekstrakta trave ive proširit će se znanstvena saznanja o potencijalnim biološkim učincima koji se mogu eksprimirati na *in vitro* i *in vivo* modelima unutar određenog koncentracijskog raspona, a sve u svrhu potencijalne komercijalne primjene u obliku funkcionalnih bombonskih proizvoda. Primjenom razvijene inkapsulacijske tehnike omogućit će se bolje očuvanje biološke vrijednosti ekstrakta trave ive. Integracija postupaka ekstrakcije i inkapsulacijskih tehnika značajno će doprinijeti valorizaciji bioaktivnog potencijala trave ive i razvoju tržišnog segmenta funkcionalnih konditorskih proizvoda.

2. OPĆI DIO

2.1. Povijesni značaj i status tradicionalnih biljnih vrsta

Selekcija i pomna sistematizacija biljnih vrsta i njihovih preparata na temelju iskustava i praksi prenošenih generacijama, poput egipatskog Ebersovog papirusa kao najstarijeg sustavnog medicinskog zapisa o djelovanju 800 ljekovitih biljaka ili enciklopedije kineske herbologije iz 16. st. zvane Compendium of Materia Medica, s 11 096 medicinskih recepata, jasno dokazuje njihovu povijesnu ulogu u liječenju i prevenciji različitih bolesti (Aboelsoud, 2010; Li i Weng 2017). Tijekom biološke evolucije razvijeni su različiti biljni metaboliti specijalizirani za posrednu ulogu u biološkoj komunikaciji među vrstama, a što ih prilagođava posjedovanju biološki aktivnih učinaka sličnim lijekovima, jasno prepoznatih od strane čovjeka kroz dugu tradiciju primjene (Li i Weng, 2017). Razvojna i ekonomska uloga tradicionalnih biljnih vrsta jasno se ogleda u začecima moderne ere farmaceutske industrije, kao i razvoja metoda za organske kemijske sinteze, primarno potaknutih u 19. st. izolacijom morfija kao alkaloida i opioidnog analgetika iz vrtnog maka (*Papaver somniferum*) (Patridge i sur., 2015). Među mnogobrojnim otkrićima bioaktivnih spojeva koji su danas u sintetiziranom obliku neizostavni terapijski lijekovi, vrijedno je spomenuti visokoučinkoviti antimalarijski lijek artemisinin koji je 1970.-tih izoliran iz slatkog pelina (*Artemisia annua*). Obzirom na globalni značaj i očuvanje milijuna života, kineska kemičarka Youyou Tu zaslužna za ovo otkriće dobila je Nobelovu nagradu za medicinu 2015. godine (Tu, 2011). Među 20 % farmaceutskih proizvoda podrijetlom iz biljnih izvora, od ukupno svih odobrenih, značajno je spomenuti jedan od najpoznatijih analgetika i antipiretika-acetilsalicilnu kiselinu kao sintetski derivat salicina izoliran iz ekstrakta bijele vrbe (*Salix alba*), zatim diterpenski alkaloid paklitaksel izoliran iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) i indolne alkaloidne vinblastin i vinkristin, oba izolirana iz vinke (*Catharanthus roseus*), a koji se danas u klasičnoj medicini koriste kao esencijalni kemoterapeutici, alkaloid galantamin izoliran iz visibabe (*Galanthus caucasicus*) kao lijek za Alzheimerovu bolest i mnoge druge. (Allen i Hatfield, 2004; Wani i sur., 1971; Neuss i sur., 1959; Samochocki i sur., 2003).

Tijekom posljednjih deset godina, na globalnoj razini vidljiva je značajna revitalizacija statusa tradicionalnih biljnih vrsta kroz ulaganja u razvoj i unaprjeđenje regulativa za biljne pripravke (WHO, 2019). COVID-19 pandemija dodatno je osnažila konzumaciju tradicionalnih biljnih vrsta u cilju jačanja imunološkog sustava i prevencije oboljenja, a što se osobito odrazilo na tržište Kine i Indije u kojima primjena biljnih lijekova zauzima važan status (Zhang i sur.,

2020). Provedene kliničke studije u Kini dokazale su visoku učinkovitost šest formulacija iz praksi tradicionalne kineske medicine (eng. *TCM*) u liječenju blagih i umjernih COVID simptoma te značajnom zaustavljanju progresije umjerenih do teških simptoma (NATCM, 2020; Si i sur., 2023). Sve formulacije su multikomponentne, a provedena istraživanja su utvrdila biološku ulogu prisutnih polifenolnih spojeva, odnosno feniletanoidnih glikozida i flavonoida, kao inhibitora SARS-CoV-2 proteaze (Cheohen i sur., 2023).

Osnivanjem Svjetskog centra za tradicionalnu medicinu unutar Svjetske zdravstvene organizacije u Indiji (2022) i održavanjem Prve globalne konferencije o tradicionalnoj medicini (2023), službeno je prepoznat ekonomski potencijal i zdravstveni kapacitet tradicionalne medicine, uključujući i primjenu tradicionalnih biljnih vrsta, s glavnim ciljem ulaganja u znanstvena istraživanja i najnoviju tehnologiju (WHO, 2022; WHO TEAM, 2023). Glavna misija osnovanog Centra je: kreirati jedinstvenu svjetsku bazu podataka primjene tradicionalne medicine, provoditi i ulagati u istraživanja i testiranja tradicionalnih pripravaka prema međunarodnim standardima za utvrđivanje bioloških učinaka i sigurnih doza te postati jedinstvena globalna platforma za okupljanje eksperta i razmjenu znanja iz područja tradicionalne medicine (WHO, 2022).

U ostvarivanju zadanih ciljeva neophodno je uključiti: i) napredne preparativne, analitičke i IT metodologije za brzu i preciznu strukturnu karakterizaciju spojeva iz biljnih ekstrakata, a koji su odgovorni za biološke učinke, ii) istraživanja usmjerena prema detekciji mehanizma biološkog djelovanja pojedinačnog prirodnog spoja ili preparata i njihovih kombinacija koje se tradicionalno konzumiraju, iii) razvoj biotehnoških strategija za održivu proizvodnju i standardizaciju pripravaka te iv) razvoj formulacija na bazi što manjeg broja bioaktivnih spojeva, a koje mogu u velikoj mjeri replicirati učinak multikomponentnih biljnih pripravaka (Li i Weng, 2017).

Najnovija istraživanja na području genomike, metabolomike, bioinformatike, analitičke kemije i sintetske biologije mogu prevladati prehodno spomenute izazove. Primjerice, napredni algoritmi primjenjuju se u ispitivanju profila ekspresije svih gena određenih humanih staničnih linija „tretiranih“ bazom podataka ciljanog spoja (Li i Weng, 2017). Tako su npr. bioinformatičkom analizom triterpenoida vitaferina A, izoliranog iz ajurvedske biljke *Withania somnifera*, utvrđena njegova antidijabetička svojstva s funkcijom regulatora lučenja leptina (Lee i sur., 2016), dok je genistein prepoznat kao potencijalni inhibitor proliferacije stanica karcinoma dojke (Sharma i sur., 2022). Na području analitičke kemije, Makoto Fujita sa svojim suradnicima predstavio je revolucionarnu tehnologiju za apsolutnu identifikaciju kemijske strukture tzv. „metodom kristalnih spužvi“ s mikro- do nanograma potrebnog spoja, a što bi

značajno ubrzalo strukturnu elucidaciju kompleksnih prirodnih spojeva ovisnu o relativno dugotrajnim izolacijama za izdvajanje dostatnih količina za samu analizu (Inokuma i sur., 2013; Zhou i sur., 2024). Primjena umjetne inteligencije, poput različitih neuralnih mreža i prediktivnih modela prema dostupnim bazama podataka također postaje neizostavan alat za predikciju biološki aktivnih spojeva i metabolita, identifikaciju molekularnih mehanizama bioloških učinaka, predikciju apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja spojeva te identifikaciju markera za kontrolu kvalitete lijekova i sl. (Zhang i sur., 2023; Yang i sur., 2022; Hadni i Elhallaouia, 2022; Zhao i sur., 2023).

2.2. Tradicionalne biljne vrste roda *Teucrium*

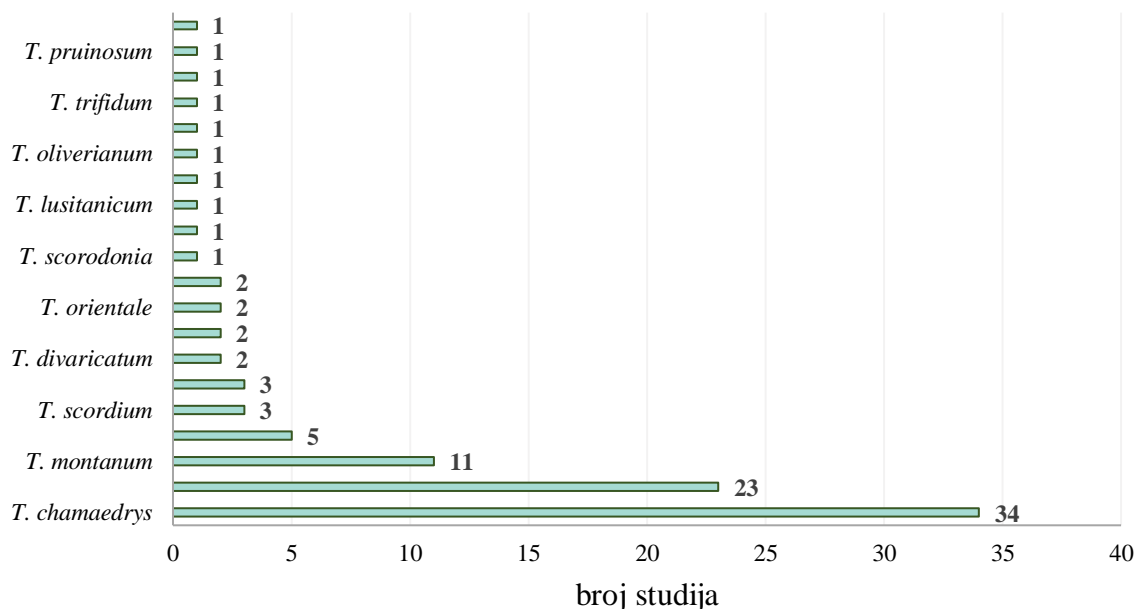
Uz Asteraceae i Fabaceae, porodica Lamiaceae, s ukupno 245 rodova i 7886 biljnih vrsta većinom rasprostranjenih na području mediteranskog bazena, predstavlja ekonomski najvažniju porodicu biljnih vrsta (Çalış i sur., 2021). Duga povijest primjene u tradicionalnoj medicini, ali i u proizvodnji hrane, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, proizvodnji aroma, posljedica je bogatog sastava biološki aktivnih spojeva poput polifenola, eteričnih ulja, saponina, alkaloida i dr. Osim komercijalno zastupljenih aromatičnih biljnih vrsta, poput mente, origana, bosiljka, kadulje, ružmarina, lovora, matičnjaka i mnogih drugih, postoji veliki broj nedovoljno istraženih biljnih vrsta iz Lamiaceae porodice s limitiranom uporabom (Michel i sur., 2020).

Teucrium L. (eng. *germander*) je rod s 300 identificiranih samoniklih i grmolikih biljnih vrsta koje pretežito rastu kao višegodišnje zeljaste biljke. Premda su kozmopolitski rasprostranjene u Europi, Sjevernoj Africi i određenim dijelovima Azije, čak 96 % biljnih vrsta iz ovog roda raste na području mediteranskog bazena (Tutin i sur., 1972).

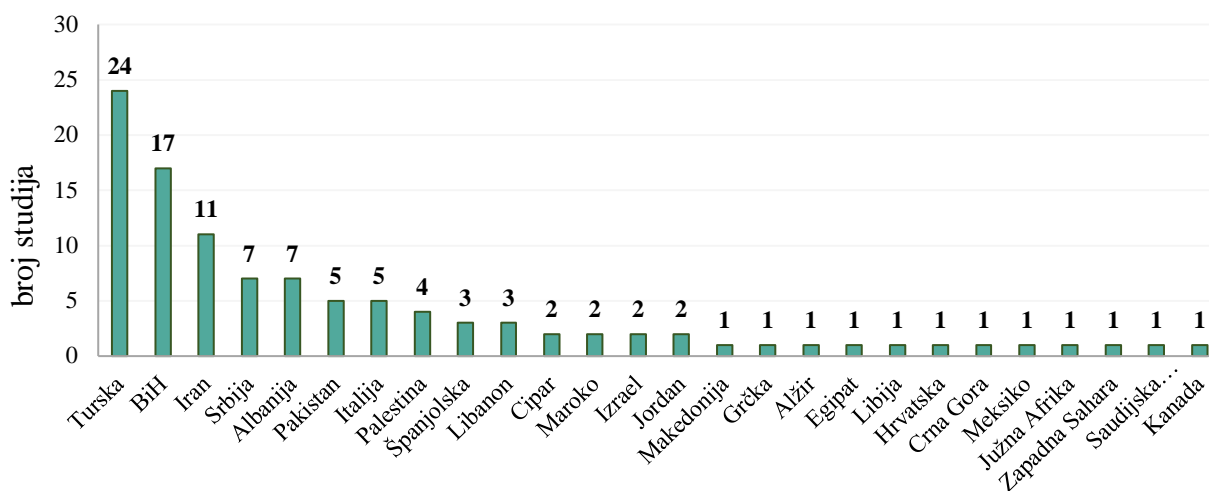
Prvi podaci korištenja *Teucrium* vrsta sežu iz grčke mitologije te je ime *Teucrium* navodno derivirano od imena Teukros (Teucer), sina Telamona, ujedno i kralja grčkog otoka Salamina, a koji je prvi primijenio biljku ovog roda u ljekovite svrhe u zacjeljivanju rana (Carnoy, 1959). *Teucrium* vrste koriste se preko dva tisućljeća, još iz antičkih vremena za liječenje kašlja i astme (Menichini i sur., 2009). Prema prvim konkretnijim farmaceutskim zapisima, a koji datiraju iz doba Perzije, spominje se uporaba dekokta *T. montanum* L. u liječenju glavobolja. Nadalje, među srednjovjekovnim farmaceutskim zapisima o terapijskim svojstvima biljnih vrsta (lat. *materia medica*) i prikupljenoj metodologiji primjene korištenima među židovskim stanovništvom (11.-13. st.) dvaput se spominje *T. capitatum* L. za liječenje očnih bolesti, probavnih tegoba i dojenačkih grčeva (Lev, 2007). Ostali povijesni dokazi

tradicionalnog korištenja *Teucrium* vrsta, konkretnije *T. micropodioides*, u liječenju respiratornih bolesti uključuju kolekciju botaničkih recepata i tretmana (tzv. Iatrosophikon) pronađenih u jednom manastiru na Cipru iz razdoblja Otomanskog Carstva (16-19.st), kao i sustavne botaničke spise eminentnih europskih travara i botaničara poput Tabernaemontanususa i Fuchsa iz 16. i 17. st, a u kojima se spominje ljekovita uporaba nadzemnog dijela *T. chamaedrys* L. u obliku preparata kuhanog u vinu (Lardos, 2006; Adams i sur., 2009).

Skup saznanja i praksi vezanih za korištenje *Teucrium* vrsta u tradicionalnoj medicini sažet je u etnobotaničkim studijama. U prikupljene 72 studije, identificirano je 20 *Teucrium* vrsta konkretno korištenih u humanoj i/ili veterinarskoj medicini te u druge svrhe (Jarić i sur., 2020). Od svih *Teucrium* vrsta, najčešće spomenuta je *T. chamaedrys* na području Turske, u 13 studija od ukupno 34. *T. polium* je proučavana u ukupno 23 studije, a njena uporaba je najviše poznata u Iranu (6 studija) i Turskoj (5 studija). Znatno manje dostupnih istraživanja (ukupno 11) veže se za *T. montanum*, najviše s područja Bosne i Hercegovine (5 studija) i Srbije (4 studije). Za ostale *Teucrium* vrste broj studija se kreće između 1 i 5. Iako relativno mali, najveći broj dokumentiranih istraživanja na temu ljekovite primjene ovih biljnih vrsta odnosi se na Tursku, Bosnu i Hercegovinu Srbiju i Albaniju, dok su dostupna saznanja o biološkim učincima i etnomedicinskim praksama vrlo limitirana u ostalim zemljama, uključujući i Hrvatsku (Slike 1 i 2).



Slika 1. Zastupljenost pojedinih *Teucrium* vrsta u dostupnim etnobotaničkim studijama (Jarić i sur., 2020).



Slika 2. Dostupne studije primjene *Teucrium* vrsta u različitim državama (Jarić i sur., 2020).

Premda je u Hrvatskoj identificirano 12 *Teucrium* vrsta, nema dostupnih zapisa o njihovoj tradicionalnoj primjeni. Geografska rasprostranjenost u Hrvatskoj ovisi o vrsti, a najveći dio *Teucrium* vrsta raste duž jadranske obale, zaleđa i otoka (Tablica 1). U istraživanju primjene aromatičnih biljnih vrsta kod lokalnog stanovništva u dijelu dubrovačke regije, Dolina i Ćuczaj (2014) istaknuli su izuzetno slabo praćenje i dokumentiranost primjene ljekovitih biljnih vrsta u Hrvatskoj kroz povijest, obzirom na izuzetnu bioraznolikost hrvatske flore (treća u Europi nakon Slovenije i Albanije) i tradiciju njene primjene.

Tablica 1. Identificirane *Teucrium* vrste u Hrvatskoj (Jeran i sur., 2023)

| Vrsta | Distribucija |
|------------------------------------|---|
| <i>Teucrium arduinii</i> | jadranska obala i zaleđe, južni otoci, endem Balkanskog poluotoka |
| <i>Teucrium aureum</i> Schreb. | ne postoji konkretan zapis (vrlo rijetka) |
| <i>Teucrium botrys</i> | široka rasprostranjenost |
| <i>Teucrium chamaedrys</i> | široka rasprostranjenost |
| <i>Teucrium flavum</i> | jadranska obala, zaleđe i otoci |
| <i>Teucrium fruticans</i> | jadranska obala, zaleđe i otoci |
| <i>Teucrium marum</i> | Lika |
| <i>Teucrium montanum</i> | jadranska obala i zaleđe, otoci |
| <i>Teucrium polium</i> | jadranska obala i zaleđe, otoci |
| <i>Teucrium scordium</i> | jadranska obala i zaleđe, otoci, kontinentalna Hrvatska |
| <i>Teucrium scorodonia</i> | planine |
| <i>Teucrium x rohlenae</i> K. Malý | dalmatinsko zaleđe |

Dostupne fitokemijske i farmakološke studije na *Teucrium* vrstama potvrdile su različita biološka djelovanja, poput antiupalnog i antiulcerogenog (Sghaier i sur., 2011a), hepatoprotektivnog (Shtukmaster i sur., 2010), anitkancerogenog (Sghaier i sur., 2011b), antimikrobnog (Vuković i sur., 2007) i dr., a što se pripisuje prisutnošću različitih biološki aktivnih spojevima, odnosno eteričnim uljima, fenolnim kiselinama i njihovim derivatima, flavonoidima i drugim sekundarnim metabolitima (Yin i sur., 2009). Biljne infuzije i dekoti dokumentirani su kao najčešći oblik konzumacije *Teucrium* vrsta, premda se spominju i tinkture, alkoholni napitci, balzami ili svježe usitnjene mješavine u medu, ovisno o ciljanoj primjeni. U čak 56 od prethodno spomenute 72 studije, tako pripremljeni pripravci koristili su se za liječenje bolesti probavnog sustava, probavnih smetnji i grčeva, ali se ispitivala i primjena u liječenju kardiovaskularnih oboljenja (hemoroidi, hipertenzija-21 studija), respiratornih oboljenja (gripa, upala pluća, tuberkuloza, kašalj i sl.-17 studija), endokrinoloških poremećaja (16 studija), kožnih i mišićno-koštanih oboljenja (14 studija), kao i vrućica, ginekoloških tegoba, malarije, neuroloških poremećaja, glavobolja, neutralizacije toksina i dr. (Jarić i sur., 2020).

Ispitivana je i primjena vrsta *T. chamaedrys*, *T. trifium* i *T. scorodonia* u veterinarskoj praksi u svrhu liječenja bolesti žlijezda slinovnica, mastitisa i vrućica (Nedelcheva i sur., 2017; Van Wyk i sur., 2008; Lans i sur., 2007).

Ostale primjene uključuju primjenu u pripremi jela i napitaka (González-Tejero i sur., 2008), odnosno za aromatiziranje i obogaćivanje vina, likera i jakih alkoholnih pića (Di Sanzo i sur., 2013), pa čak i piva (Maccioni i sur., 2007) te u pripremi aromatiziranih sireva (Di Novella i sur., 2013).

U Tablici 2 sistematizirane su različite tradicionalne primjene do sad identificiranih *Teucrium* vrsta, kao i porijeklo ispitivanog biljnog materijala, odnosno države primjene te oblici konzumacije

Tablica 2. Tradicionalna uporaba najčešće korištenih *Teucrium* vrsta

| Vrsta | Tradicionalna primjena | Država | Korišteni dio biljke | Oblik konzumacije | Referenca |
|--------------------------|--|---------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>T. chamaedrys</i> | ublažavanje abdominalnih bolova i grčeva | Turska | nadzemni dio | infuzija | Özdemir i Alpınar (2015) |
| | | Turska | grančice cvijeta | infuzija | Polat i sur. (2013) |
| | | Izrael | listovi | dekoka | Said i sur. (2002) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Šarić-Kundalić i sur. (2011) |
| | | Turska | cijela biljka/nadzemni dio | infuzija | Sezik i sur. (2001) |
| | liječenje probavnih smetnji (konstipacija, dijareja) | Turska | cijela biljka/nadzemni dio | infuzija/dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Redžić (2007) |
| | | Srbija | listovi | infuzija | Šavikin i sur. (2013) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Savić i sur. (2019) |
| | liječenje zubobolje | Turska | cijela biljka/nadzemni dio | infuzija/dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | liječenje hemoroida | Turska | listovi/cvjetovi | infuzija | Ari i sur. (2015) |
| | | Turska | nadzemni dio | kupka u dekoktu | Paksoy i sur. (2016) |
| | antidijabetičko djelovanje | Kosovo | cijela biljka | infuzija | Mustafa i sur. (2012) |
| | | Turska | nadzemni dio | dekoka | Güzel i sur. (2015) |
| | liječenje upale grla | Turska | nadzemni dio | dekoka | Sargin (2015) |
| | liječenje ekcema | Turska | nadzemni dio | infuzija | Bulut i Tuzlacı (2015) |
| | liječenje malarije | Italija | nadzemni dio | dekoka | Pieroni i sur. (2004) |
| | | Italija | nadzemni dio | / | Pieroni i Quave (2005) |
| | liječenje vrućice/gripe | Albanija | nadzemni dio | infuzija | Pieroni (2008) |
| | | Turska | nadzemni dio | infuzija | Polat i sur. (2013) |
| liječenje psorijaze | Palestina | cvjetovi | dekoka | Shawahna i Jaradat (2017) | |
| sedativno djelovanje | Turska | nadzemni dio | infuzija | Polat i sur. (2013) | |
| antireumatsko djelovanje | Turska | nadzemni dio | infuzija/dekokt | Kaval i sur. (2014) | |
| liječenje nesаницe | Libanon | nadzemni dio | infuzija | Baydoun i sur. (2015) | |

nastavak Tablice 2

| | | | | | |
|---|---|------------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <i>T. polium</i> | ublažavanje abdominalnih bolova i grčeva | Turska | nadzemni dio | svježa biljka/dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | | Turska | nadzemni dio | infuzija/dekokt | Akgul i sur. (2018) |
| | | Iran | listovi/cvjetovi/sjeme | dekokt | Safa i sur. (2013) |
| | | Izrael | listovi | dekokt | Said i sur. (2002) |
| | liječenje probavnih smetnji (konstipacija, dijareja) | Turska | nadzemni dio | svježa biljka/dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | | Iran | listovi/cvjetovi | infuzija/dekokt/termički obrađen nadzemni dio | Mosaddegh i sur. (2012) |
| | bolesti jetre i bubrega | Izrael | listovi | dekokt | Said i sur. (2002) |
| | | Iran | nadzemni dio | dekokt | Ghorbani (2005) |
| | hemoroidi | Turska | nadzemni dio | infuzija/pripravak na bazi meda | Bulut i Tuzlaci (2015) |
| | | Turska | nadzemni dio | dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | ženske bolesti (poremećaji menstrualnog ciklusa, postporođajno razdoblje, infekcije, spontani pobačaji) | Iran | listovi/cvjetovi | infuzija/dekokt/termički obrađen nadzemni dio | Mosaddegh i sur. (2012) |
| | | Iran | listovi/cvjetovi/sjeme | dekokt | Safa i sur. (2013) |
| | antidijabetičko djelovanje | Turska | nadzemni dio | dekokt | Bulut i Tuzlaci (2013) |
| | | Turska | nadzemni dio | svježa biljka/dekokt | Altundag i Ozturk (2011) |
| | neutralizacija otrova (ugriz zmije, škorpiona) | Iran | listovi/cvjetovi/sjeme | prah | Safa i sur. (2013) |
| dermatološke bolesti (zacjeljivanje, vodene kozice, ospice) | Iran | listovi/cvjetovi/sjeme | prah | Safa i sur. (2013) | |
| | Palestina | listovi | / | Jaradat (2005) | |
| liječenje sunčanice | Turska | nadzemni dio | svježa biljka | Baydoun i sur. (2015) | |

nastavak Tablice 2

| | | | | | |
|----------------------|--|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------------------|
| <i>T. stockianum</i> | pročišćavanje krvi | Pakistan | listovi/cvjetovi | infuzija | Hussain i sur. (2018) |
| | | Pakistan | listovi/sjeme | prah | Khan i sur. (2018) |
| | liječenje malarije | Pakistan | listovi/cvjetovi | infuzija | Hussain i sur. (2018) |
| | antipiretičko djelovanje | Pakistan | listovi/cvjetovi | infuzija | Hussain i sur. (2018) |
| | plućne bolesti (upala pluća, ekspektorant) | Pakistan | listovi/sjeme | prah | Khan i sur. (2018) |
| | | Pakistan | listovi | / | Ahmad i sur. (2013) |
| | artritis | Pakistan | listovi/sjeme | prah | Khan i sur. (2018) |
| | regulacija krvnog tlaka | | | | |
| iscrpljenost | Iran | listovi | dekotk/svježa biljka | Safa i sur. (2013) | |
| detoksikacija | | | | | |
| <i>T. scordium</i> | liječenje probavnih smetnji i bolesti | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Redžić (2007) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Šarić-Kundalić i sur. (2010b) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | / | Šarić-Kundalić i sur. (2011) |
| <i>T. arduini</i> | liječenje probavnih smetnji i bolesti | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Redžić (2007) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Šarić-Kundalić i sur. (2010a) |
| | | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Šarić-Kundalić i sur. (2011) |

Od ostalih *Teucrium* vrsta čija je primjena zapisana u etnobotaničkim studijama, *T. divarticum* se tradicionalno koristi za liječenje probavnih smetnji, gripe i prehlada, kašlja, urinarnih bolesti na području Cipra i Turske (Arnold, 1985; Gürdal i Kültür, 2013). *T. capitatum* za liječenje psorijaze, dijabetesa, neuroloških poremećaja, nesanice i grčeva na području Palestine i Libanona (Shawahna i Jaradat, 2017; Baydoun i sur., 2015), *T. orientale* za liječenje vrućice i promuklosti (Safa i sur., 2013; Baydoun i sur. 2015), *T. fructans* za liječenje respiratornih, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti (Fatiha i sur., 2017; González-Tejero i sur., 2008). Preostale vrste (navedene na Slici 1) pronašle su vrlo slične primjene kao i prethodno spomenuti primjeri, poput liječenja grčeva, različitih probavnih smetnji, prehlada i gripe, dermatoloških poremećaja, kao analgetici i sl. (González-Tejero i sur., 2008; Altundag i Ozturk, 2011; Baydoun i sur., 2015; Khan i sur., 2018). Posebno se izdvaja primjena *T. cubense* kao parfemske kure za stimulaciju rasta kose među stanovništvom Zapadne Sahare (Estrada-Castillón i sur., 2018).

2.2.1. Trava iva (*T. montanum* L.)

Trava iva ili na eng. *mountain germander* je treća najistraženija biljna vrsta iz *Teucrium* roda. Raste kao priligli grm s poludrvenim grančicama, i to na termofilnim vapnencima i serpentinskim stijenama te obroncima brda i planina u periodu između lipnja i rujna, a prepoznatljiva je po duguljasto lancetnim listovima i blijedožučkastim cvjetovima na vrhovima grančica. O njezinom ljekovitom značaju među lokalnim stanovništvom dovoljno govori izreka prenošena generacijama-„trava iva od mrtva pravi živa“ (Redžić, 2010).



Slika 3. Trava iva u osušenom obliku (*lijevo*- jedan od vaučera trave ive pohranjenog u kolekciju sveučilišne herbarijske zbirke Herbarium Croaticum u sastavu Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, *desno*- primjerak očišćenog i osušenog uzorka trave ive korištenog u eksperimentu.

U tradicionalnoj primjeni, uglavnom se koristi u obliku biljnih infuzija i dekokta za prevenciju i liječenje probavnih smetnji i bolesti, respiratornih oboljenja, dijabetesa, astme i dr., kako je navedeno u Tablici 3. Najviše etnomedicinskih zapisa vezanih za konkretnu primjenu trave ive ima u Bosni i Hercegovini te Srbiji, dok je u Hrvatskoj dostupno samo jedno istraživanje, i to na temu lokalne tradicije korištenja samoniklih biljnih vrsta u okolini Dubrovnika s uključena 42 sudjelnika iz 23 sela (Dolina i Luczaj, 2014). U njemu se, uz dugogodišnju primjenu različitog samoniklog začinskog bilja, spominje i tradicionalna primjena trave ive, uglavnom u obliku biljne infuzije ili dodatka jakom alkoholnom piću (rakija).

Tablica 3. Pregled literature vezane za tradicionalnu primjenu *T. montanum*

| Tradicionalna primjena | Država/lokalitet | Korišteni dio biljke | Oblik konzumacije | Referenca |
|---------------------------------------|--|----------------------|---|-------------------------------|
| liječenje probavnih smetnji i bolesti | Bosna i Hercegovina / planina Javor | nadzemni dio | infuzija | Savić i sur. (2019) |
| | Bosna i Hercegovina / sjeverno-istočni dio | nadzemni dio | / | Šarić-Kundalić i sur. (2011) |
| | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Redžić (2007) |
| | Srbija / Zlatibor | nadzemni dio | infuzija | Šavikin i sur. (2013) |
| bolesti jetre | Bosna i Hercegovina | nadzemni dio | infuzija | Redžić (2007) |
| | Crna Gora / planina Prokletije | nadzemni dio | infuzija | Menković i sur. (2011) |
| čišćenje žučnih kanala | Bosna i Hercegovina/sjeverno-istočni dio | nadzemni dio | / | Šarić-Kundalić i sur. (2011) |
| jačanje imuniteta | Srbija / planina Rtanj | nadzemni dio | infuzija | Zlatković i sur. (2014) |
| pročišćavanje krvi | Bosna i Hercegovina / planina Vranica, Prokoško jezero | nadzemni dio | infuzija | Šarić-Kundalić i sur. (2010a) |
| liječenje reume i artritisa | | nadzemni dio | balzam | |
| ublažavanje grčeva | | nadzemni dio | infuzija | |
| glavobolje | Srbija/ Suva planina | nadzemni dio | infuzija | Jarić i sur. (2015) |
| | Iran* | nadzemni dio | dekoka | Zarshenas i sur. (2013) |
| tuberkuloza | Srbija/ Suva planina | nadzemni dio | infuzija/kupka a /inhalacija [#] | Jarić i sur. (2015) |
| antidijabetični učinak | Bosna i Hercegovina/Lukomir | / | / | Ferrier i sur. (2014) |
| / | Hrvatska/obala Dubrovnika | cvjetovi/listovi | infuzija/likeri /rakija | Dolina i Łuczaj (2014) |

*farmaceutski zapisi od 8.-18.st. nakon Krista

[#]mješavina sa *Anthemis tinctoria* L., preporučena je kombinacija unutarnje i vanjske aplikacije

Prema dosad provedenim fitokemijskim studijama, snažna antioksidacijska i antimikrobna aktivnost različitih ekstrakata trave ive pripisuju se polifenolnim spojevima (Đilas i sur., 2006; Stanković i sur., 2011a). U cilju ispitivanja maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti prisutnih polifenola, Tumbas i sur. (2004) selektirali su otapala različitih relativnih polarnosti za ekstrakciju polifenola. Ekstrakcija biljnog materijala (20 g) provedena je tehnikom maceracije (2×24 sata) u 70 %-tnom metanolu (v/v) (2×500 mL), pri čemu je

supernatant izdvojen, uparen do suhog i kao takav tretiran kao metanolni ekstrakt. Ostatak taloga nakon ekstrakcije metanolom resuspendiran je u butanolu, vodi, etil acetatu, kloroformu i petroleteru i dvostruko ekstrahirano (2×20 mL). Rezultati ukupnog udjela polifenola (TPC) dobiveni redom: 296 > 154 > 60 > 32 > 0 > 0 u mg g⁻¹ s. tv. ekstrakta odgovaraju otapalima redom: butanol-1 > methanol > voda > etil acetat > kloroform > petroleter. Metanol kao otapalo u kombinaciji s tehnikom maceracije (1 g : 100 mL, 24 sata) i ultrazvučne ekstrakcije u kupelji (1 g : 100 mL nakon dekantiranja, 45 minuta) također se pokazalo prikladnim za ekstrakciju dominantnih, relativno polarnih polifenolnih spojeva u radu Mitreskog i sur. (2014), dobivši HPLC-UV analizom ukupno 142 mg polifenolnih spojeva g⁻¹ s. tv. ekstrakta pri čemu je otprilike 90 % ukupne vrijednosti činio udjel feniletanoidnih glikozida, a tek oko 7 % udjel flavonoida. Oba rezultata su usporediva s udjelom TPC-a (169 mg g⁻¹ s. tv. ekstrakta) u metanolnom ekstraktu (1 g : 20 mL, 24 sata, dvostruka ekstrakcija uz međukorak dekantiranja) iz rada Stankovića i sur. (2011b). U ovom radu je određen i udjel ukupnih flavonoida (TFC) od 88,31 mg RUE g⁻¹ u acetonskom ekstraktu trave ive. Nadalje, Grubešić i sur. (2012) ispitivali su razlike u udjelima TPC-a i ukupnih tanina između sakupljenog (TI_s) i kultiviranog nadzemnog dijela trave ive (TI_k) trave ive podrijetlom iz Hrvatske (Gornje Jelenje, 800 m nadmorske visine), korištenjem konvencionalne ekstrakcije (70 °C, 15 minuta, 0,25 g : 80 mL, 30%-tni metanol, v/v), pri čemu je dobiven relativno visok udjel za oba ispitivana parametra, bez značajnije razlike u udjelima (TPC_TI_s=13,7 % i TPC_TI_k=12,8 %, tanini_TI_s=3,5%, tanini_TI_k=3,1 % na s. tv. biljnog materijala).

Potencijalni antioksidacijski kapacitet, kao i korelacija između antioksidacijske aktivnosti i udjela TPC-a, ukupnih flavonoida i/ili analiziranih ukupnih polifenolnih spojeva kromatografskim metodama također su ispitivani različitim metodama. Tako su Kadifkova-Panovska i sur. (2005) analizirali kapacitet ekstrakta trave ive u „gašenju“ DPPH slobodnih radikala, sposobnost ekstrakta u gašenju hidroksil radikala generiranih u prisutnosti sustava Fe³⁺/askorbat/EDTA/H₂O₂ i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta korištenjem modelnog sustava β-karotena/linolne kiseline, sve usporedno s pozitivnim kontrolama. Najprije je pripremljen 70 %-tni etanolni ekstrakt (1 g : 10 mL, maceracija kroz 24 sata), ukupan udjel flavonoida=0,15 % s. tv. biljnog materijala), a nakon uparavanja vodena faza ekstrakta je naknadno ekstrahirana u etil acetatu, dietil eteru i butanolu (0,01 g mL⁻¹ kao eksperimentalna koncentracija). Ekstrakt u dietil eteru pokazao je najveći antioksidacijski kapacitet neutralizacije DPPH radikala (IC₅₀=10 mg mL⁻¹), no ipak značajno manji u usporedbi s kontrolama luteolina (IC₅₀=0,09 mg mL⁻¹), kvercetina (IC₅₀=0,06 mg mL⁻¹) i silimarina (IC₅₀=1,96 mg mL⁻¹). Međutim, detektirana je jednako učinkovita antioksidacijska aktivnost svih ekstrakata u neutralizaciji hidroksilnih

radikala ($I_{OH}=45\%$), usporedno s prethodno spomenutim referentnim spojevima ($I_{OH}=42-48\%$). Usporedno sa butiliranim hidroksianizolom (BHA) kao kontrolom, svi ekstrakti trave ive ($0,4\text{ mg mL}^{-1}$) pokazali su dobar potencijal u preveniranju lipidne peroksidacije, no ipak manji u odnosu na BHA. Đilas i sur. (2006) su pak detektirali visoku učinkovitost butanolnog ekstrakta ($IC_{50}=0,045\text{ mg mL}^{-1}$) u neutralizaciji DPPH radikala u odnosu na askorbinsku kiselinu ($IC_{50}=0,035\text{ mg mL}^{-1}$). Korelacija između TPC-a (175 mg GAE g^{-1} s. tv. ekstrakta) i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH (176 mg TE g^{-1} s. tv. ekstrakta) i FRAP (142 mg AAE g^{-1} s. tv. ekstrakta) metodama u ekstraktu trave ive, dobivenog pri optimiziranim parametrima temperature i tlaka primjenom ekstrakcije subkritičnom vodom ($160\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 bara), potvrđena je u radu Nastić i sur. (2018). Sličan zaključak iznešen je i u radu Zlatić i sur. (2017), ukazujući na visoku linearnu korelaciju između izmjenjenog TPC ($143-190\text{ mg GAE g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta), ukupnih flavonoida ($47-54\text{ mg RUE g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta) i antioksidacijske aktivnosti ($IC_{50}=48-62\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) metanolnih ekstrakata trave ive prikupljene s različitih staništa u Srbiji ($R^2=0,86$). Usporedno s drugim Lamiaceae vrstama, Vladimir-Knežević i sur. (2014) u istraživanju su ukazali na relativno visok antioksidacijski kapacitet etanolnog ekstrakta *T. montanum* ($IC_{50\text{ DPPH}}=7,8\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Usporedno s ekstraktima trave ive na bazi organskih otapala ($45-221\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), Stanković i sur. (2011b) odredili su značajno učinkovitiju neutralizaciju DPPH slobodnih radikala kod vodenog ekstrakta ($IC_{50}=29\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), sličnu ekstraktu zelenog čaja ($IC_{50}=21\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) i *Ginko bilobe* ($IC_{50}=34\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). U istraživanju Bektašević i sur. (2023) potvrđen je veći antioksidacijski kapacitet metanolnog macerata (70% , v/v) u odnosu na vodenu infuziju trave ive, mjereno DPPH i FRAP metodama ($H_2O_E_IC_{50\text{ DPPH}}: 38\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $H_2O_E_FRAP: 61\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$; $MetOH_E_IC_{50\text{ DPPH}}: 21\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $MetOH_E_FRAP: 1548\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$), a što je posljedica kvantitativnih udjela TPC-a ($H_2O_E: 137\text{ mg g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta; $MetOH_E: 215\text{ mg g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta) i identificiranih fenolnih kiselina, a utvrđena je i manja antioksidacijska aktivnost metanolnog i vodenog ekstrakta u odnosu na pozitivne kontrole, tj. askorbinsku kiselinu ($IC_{50\text{ DPPH}}: 16,67\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) i BHA ($IC_{50\text{ DPPH}}: 17,62\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). U najnovijem radu Sailović i sur. (2024) su pak ukazali na sličan potencijal konvencionalno pripremljenog vodenog (TPC: 109 mg g^{-1} s. tv. ekstrakta, $IC_{50}: 36\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), acetonskog (TPC: 135 mg g^{-1} s. tv. ekstrakta, $IC_{50}: 28\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) i etanolnog ekstrakta (TPC: 129 mg g^{-1} s. tv. ekstrakta, $IC_{50}: 28\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) trave ive u neutralizaciji DPPH slobodnih radikala.

U Tablici 4 sistematizirani su dosad identificirani pojedinačni polifenolni spojevi u različito pripremljenim ekstraktima, odnosno hidroksibenzojeve i hidroksicimetne fenolne kiseline, feniletanoidi i feniletanoidni glikozidi te flavonoidi trave ive.

Tablica 4. Identificirani polifenolni spojevi u različito pripremljenim ekstraktima trave ive

| <i>Spoj</i> | <i>H₂O_E</i> | <i>MetOH_E</i> | <i>EtOH_E</i> | <i>AcOH_E</i> | <i>EtylAc_E</i> | <i>But_E</i> | <i>Referenca*</i> |
|-----------------------------------|--|---|---------------|---------------|---|--|-------------------|
| <i>hidroksibenzojeve kiseline</i> | | | | | | | |
| <i>elaginska</i> | 3,51 mg g ⁻¹ s. tv. E | 7,25 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 8 |
| <i>galna</i> | 345 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E/ 0,01 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | 0,132 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | 1,2,8 |
| <i>gentizinska</i> | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 14,432 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | 1 |
| <i>protokatehinska</i> | 117 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | 0,094 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 1,337 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,051 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,2 |
| <i>siringinska</i> | 0,052 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 0,27 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,148 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 0,02 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 4,588 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,536 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,8 |
| <i>vanilinska</i> | 0,165 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 45,3 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | 1,944 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,982 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,2 |
| <i>hidroksicimetne kiseline</i> | | | | | | | |
| <i>ferulinska</i> | 48,9 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E / 0,18 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,054 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 0,08 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 0,811 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,582 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,2,3,8 |
| <i>kafeinska</i> | 0,059 mg g ⁻¹ s. tv. E / 56,0 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E / 0,71 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,125 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 0,2 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 0,515 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,210 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,2,3,4,8 |
| <i>klorogenska</i> | 0,147 mg g ⁻¹ s. tv. E / 79,9 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E / 0,40 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,21 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 3,076 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,949 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,2,3,8 |
| <i>neoklorogenska</i> | n.d. | 0,9 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4 |
| <i>p-kumarinska</i> | 15,95 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,018 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 21,98 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | 1,794 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,174 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1,3,8 |
| <i>ružmarinska</i> | 0,51 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,18 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3,8 |
| <i>sinapinska</i> | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,252 mg g ⁻¹ s. tv. E | 1 |
| <i>feniletanoidni glikozidi</i> | | | | | | | |
| <i>kerulescenozyd</i> | + | 35,6 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | + | n.d. | n.d. | 4,6 |
| <i>forzitozid B</i> | n.d. | 51,7 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4 |

nastavak Tablice 4

| | | | | | | | |
|--------------------------------|--|--|------|------|------|------|--------------|
| <i>ehinakozyd</i> | + | 12,3 mg g ⁻¹ s. tv. E, 14,78 mg g ⁻¹ s. tv. | + | + | n.d. | n.d. | 4,6,7 |
| <i>forzitozyd A</i> | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| <i>izoverbaskozid</i> | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| <i>kastanozyd a</i> | + | 5,6 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | + | n.d. | n.d. | 4 |
| <i>lipedozid a</i> | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| <i>verbaskozid (akteozid)</i> | + | 10,0 mg g ⁻¹ s. tv. E, 6,12 mg g ⁻¹ s. tv. | + | + | n.d. | n.d. | 4,6,7 |
| <i>samiozyd</i> | n.d. | 8,6 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4 |
| flavonoidi | | | | | | | |
| <i>apigenin</i> | n.d. | 0,2 mg g ⁻¹ s. tv. E/ 0,01 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4,8 |
| <i>cirsimaritin</i> | n.d. | 2,3 | + | n.d. | n.d. | n.d. | 4,5 |
| <i>cirsilineol</i> | n.d. | n.d. | + | n.d. | n.d. | n.d. | 5 |
| <i>cirsiriol</i> | n.d. | 3,5 | + | n.d. | n.d. | n.d. | 4,5 |
| <i>diosmin</i> | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| <i>diosmetin</i> | n.d. | 0,05 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 8 |
| <i>diosmetin-7-O-rutinozyd</i> | n.d. | 2,1 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4 |
| <i>epikatehin</i> | 120 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2 |
| <i>eriodiktol</i> | 0,03 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 8 |
| <i>izokvercetin</i> | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 5,6 |
| <i>kempferol</i> | 0,07 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,02 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 8 |

nastavak Tablice 4

| | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|------|------|------|------|---------|
| (+)-katehin | 115 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2 |
| kvercetin | + | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3 |
| kvercitrin | n.d. | + | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 4 |
| luteolin | 0,03 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,5 mg g ⁻¹ s. tv. E/0,04 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | + | n.d. | n.d. | 4,5,6,8 |
| luteolin-7-O-glukozid | n.d. | 0,7 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | + | n.d. | n.d. | 4,5 |
| luteolin-7-O-rutinozid | + | 3,0 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | + | n.d. | n.d. | 4,5,6 |
| miricetin | 0,13 mg g ⁻¹ s. tv. E | + | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3,8 |
| naringin | 996 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2 |
| naringenin | 0,13 mg g ⁻¹ s. tv. E | 0,76 mg g ⁻¹ s. tv. E | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 8 |
| rutin | 125 mg 100 g ⁻¹ s. tv. E | + | + | + | n.d. | n.d. | 2,3,5,6 |
| tricin | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| vicenin-2 | n.d. | n.d. | + | n.d. | n.d. | n.d. | 5 |
| ostali spojevi | | | | | | | |
| kininska kiselina | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| derivati fenolnih kiselina | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| izomeri verbaskozida | + | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| trihidroksi-oktadekadienoična kis. | n.d. | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |
| hidroksi-oktadekadienoična kis. | n.d. | n.d. | + | + | n.d. | n.d. | 6 |

H₂O_E-vodeni ekstrakt; MetOH_E-metanolni ekstrakt; EtOH_E-etanolni ekstrakt; AcOH_E-acetonski ekstrakt; EtylAc_E-etil-acetatni ekstrakt; But_E-butanolni ekstrakt; mg g⁻¹ s. tv. E-mg g⁻¹ suhe tvari ekstrakta; mg g⁻¹ s. tv.-mg g⁻¹ suhe tvari biljnog materijala; + = identificirano, ali nije kvantificirano; / = nije detektirano; 1=Tumbas i sur. (2004), korišteni 70% MetOH_E (v/v), EtylAc_E i But_E; 2= Nastić i sur. (2018), korišten H₂O_E dobiven ekstrakcijom subkritičnom vodom; 3= Stanković (2012a), korišten MetOH_E; 4= Mitreski i sur. (2014), korišten MetOH_E; 5= Harborne (1986), korišten 70% EtOH_E (v/v); 6= Sailović i sur. (2024), korišteni H₂O_E, 60% AcOH_E (v/v) i 80% EtOH_E (v/v); 7= Šeremet i sur. (2022), korišten H₂O_E; 8= Bektašević i sur., 2023., korišteni H₂O_E i 70% MetOH_E (v/v)

Pored analiza polifenolnih spojeva, dosad provedena istraživanja bila su usmjerena i na određivanje eteričnih ulja kao smjese hlapivih komponenti izdvojenih procesom hidrodestilacije. U svim radovima, polazni biljni materijal bio je nadzemni dio trave ive, a izolacija se provela u aparaturi za destilaciju po Clevengeru u trajanju od 2-3 sata. Rezultati su ukazali na dominantan udjel seskviterpenoide dok su monoterpenoidi i dr. analizirani u manjini (Tablica 5).

Tablica 5. Pregled sastava eteričnih ulja izoliranih iz trave ive s fokusom na terpenoide

| Podrijetlo | Prinos izolacije (%) | Identificirani spojevi i udjel (>1%) | Referenca |
|---|----------------------|--|-------------------------|
| Srbija (planina Orjen), 1600 m nadmorske visine | 0,15 % | <p>ukupno 47 identificiranih spojeva:</p> <p>3-oktanol (1,8 %), limonen (1,8 %), β-burbonen (1,9 %) trans-α-bergamoten (1,9 %), α-elemen (2,0 %), β-selinen (1,2 %), valencen (1,6 %), germakren D-4-ol (1,4 %), spatulenol (1,1 %), α-humulen (2,0 %), α-kadinol (3,5 %), kadinol (3,6 %), biciklogermakren (3,5 %), karofilen oksid (2,6 %), germakren D (15,0 %), α-pinen (12,4 %), β-eudesmol (10,1 %), β-karofilen (6,9 %), β-pinen (4,8 %), δ-kadinen (4,5 %), γ-kadinen (4,1 %)</p> | Kovačević i sur., 2001 |
| Srbija, planina Jadovnik | 0,47 % | <p>ukupno 50 identificiranih spojeva:</p> <p>5-(1-metiletil)-biciklo[3,1,0]heksan-2-on (1,1 %), 4-terpineol (3,9 %), cis-verbenon (1,1 %), α-kopen (1,1 %), zingiberen (1,3 %), karofilen (4,4 %), α-bergamoten (1,1 %), β-seskvifelandren (3,3 %), a-karofilen (1,9 %), b-farnesen (1,76 %), Aromadendren (1,3 %), kopen (4,2 %), α-kurkumen (1,74 %), b-selinen (8,2 %), (+)-epi-biciklo[3,1,0]heksan-2-on (1,6 %), izoleđen (1,6 %), α-murolen (1,7 %), α-cedren (2,9 %), δ-kadinen (17,2 %), α-kalakoren (5,0 %), kadina-1,4-dien (3,4 %), toreiol (3,9 %), τ-kadinol (3,1 %), γ-kurkumen (3,1 %), 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftalen (4,9 %)</p> | Vuković i sur. (2007) |
| Jabuka, Prijepolje, južnozpadna Srbija | 0,19 % | <p>ukupno 168 identificiranih spojeva:</p> <p>δ-kadinen (8,1 %), β-karofilen (5,1 %), τ-murolol (4,2 %), α-kadinol (3,5 %), epi-α-bisabolol (1,8 %), oplopanon (1,1 %), β-oplopanon (1,6 %), karofilen oksid (2,0 %), germakren D-4-ol (1,5 %), (E)-nerolidol (1,8 %), (E)-α-bisabolen (2,3 %), cis-seskvisabinen hidrat (1,9 %), γ-kadinen (3,6 %), α-murolen (2,3 %), dehidroseskvicineol (3,9 %), α-humulen (3,1 %), linalol acetat (1,9 %), cis-verbenol (1,1 %), trans-verbenol (2,9 %), α-pinen (4,0 %), β-pinen (1,6 %)</p> | Radulović i sur. (2012) |
| obronci između Trogira i Prapatnice, Hrvatska, 277 m nadmorske visine | 0,40 % | <p>ukupno 37 identificiranih spojeva:</p> <p>spatulenol (1,9%), karofilen oksid (1,0%), α-kadinol (2,2%), β-karofilen (7,1%), (Z)-β-farnesen (2,9%) germakren D (17,2%), β-bisabolen (1,8%), δ-kadinen (2,7%), β-burbonen (3,4%), α-pinen (1,9%), β-pinen (12,3%), mircen (4,2%), limonen (4,65), linalol (3,6%), trans-pinokarveol (1,2 %), kamfor (1,3%) borneol (1,6%), terpinen-4-ol (1,5%), mirtenol (1,2%) ukupni hidrokarboni (21,6%)</p> | Bezić i sur. (2011) |

| | | | |
|---|-------|---|--------------------------|
| područje Slovačkog krša, naselje Dvorníky- Včeláre, 277 nadmorske visine | 0,19% | ukupno 86 identificiranih spojeva: α -pinen (3,1%), β -pinen (2,2%), mircen (1,3%), β -burbonen (1,1%), (<i>E</i>)-karofilen (1,2%), α -trans-bergamoten (1,4%), germakren D (5,0%), δ -kadinen (1,2%), hedikarol (4,0%), (<i>E</i>)-nerolidol (13,3%), germakren-4-ol (2,1%), α -kadinol (1,5%) | Pavela i sur. (2020) |
| na planini Madonie, Contrada Quacella, Sicilija, Italija, 380 m nadmorske visine | / | ukupno 27 identificiranih spojeva: kopen (2,3 %), α -funebren (4,5 %), β -karofilen (1,9 %), β -cedren (8,9 %), α -bergamoten (2,1 %), α -humulen (2,5 %), dehidroaromadendren (3,0 %), δ -kadinen (1,8 %), 9,10-dehidro-izolongifolen (2,3 %), karofilen oksid (2,8 %), globulol (4,5 %), spatulenol (1,5 %), epiglobulol (13,5 %), longifolealdehid (14,5 %), kubenol (2,8 %), δ -kadinol (1,4 %), leden oksid (12,1 %), β -bisabolol (3,9 %), 8- <i>cedren</i> -13-ol (5,7 %) | Catinella i sur. (2021) |
| planina Rtanj, istočna Srbija, | / | ukupno 81 identificiranih spojeva: sabinen (1,1 %), limonen (3,4 %), <i>trans</i> -tujon (1,1 %), <i>trans</i> -karofilen (4,2 %), α -humulen (2,1 %), <i>trans</i> - β -farnesen (2,2 %), 9- <i>epi-trans</i> -karofilen (1,8 %), germakren D (2,2 %), γ -kadinen (1,5 %), δ -kadinen (2,2 %), <i>cis</i> -seskvisabinen hidrat (IPP vs. OH) (3,0 %), seskvisabinen hidrat (15,8 %), karofilen oksid (2,0 %), τ -kadinol (6,2 %), α -kadinol (3,8 %), heksadekanoična kiselina (4,7 %) | Aćimović i sur. (2023) |
| lokalitet Lipa, okolica Bihaća, Bosna i Hercegovina | / | ukupno 47 identificiranih spojeva: α -pinen (6,4 %), sabinen (3,3 %), β -pinen (2,7 %), limonen (1,0 %), egzo-izocitral (1,7 %), mirtenal (1,0 %), pulegon (2,3 %), α -humulen (1,8 %), germakren D (1,7 %), β -selinen (9,0 %), α -selinen (2,0 %), α -murolen (1,2 %), γ -kadinen (1,7 %), δ -kadinen (6,9 %), endo-1-burbonalol (2,6 %), germakren-D-4-ol (6,8 %), karofilen oksid (2,4 %), viridiflorol (1,1 %), guajol (1,5 %), <i>epi</i> - α -kadinol (6,9 %), α -kadinol (9,0 %), bulnesol (2,2 %), α -ciperon (2,6 %) | Bektašević i sur. (2023) |

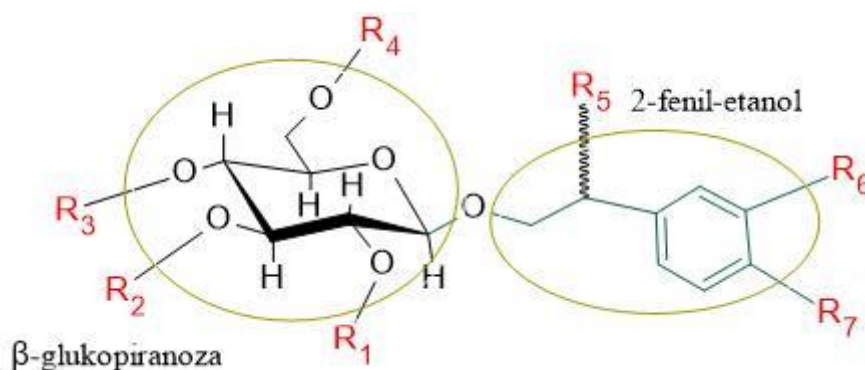
Većina prethodno navedenih studija fokusirana je na detaljnu karakterizaciju i kvantifikaciju eteričnih ulja, uz primjenu statističkih modela poput klaster analize (eng. *HCA*) i analize glavnih komponenata (eng. *PCA*). Dodatno, Bektašević i sur. (2023) odredili su relativno nizak antioksidacijski kapacitet izdvojenog eteričnog ulja ($IC_{50}=201,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) u odnosu na pozitivne kontrole, tj. butilirani hidroksianizol ($IC_{50}=17,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) i askorbinsku kiselinu ($IC_{50}=16,7 \mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2.1.1. Feniletanoidni glikozidi

Feniletanoidni glikozidi čine skupinu relativno kompleksnih, prirodnih glikoziliranih spojeva akumuliranih u korijenu i svim nadzemnim dijelovima biljke u varijabilnim koncentracijama (Jiménez i Riguera, 1994; Xue i Yang, 2016). Najpoznatiji predstavnici ove skupine spojeva su ehinakozid i verbaskozid, izolirani po prvi puta 1950. godine iz *Ehinaceae angustifolia*, odnosno 1963. godine iz *Verbascum sinuatum* (Stoll i sur., 1950; Scarpati i Monache, 1963). Do sad je identificirano minimalno 570 feniletanoidnih glikozida, a najviše

izoliranih je iz porodice Orobanchaceae (min. 69 iz *Cistanche herba*), Oleaceae (min. 51 iz *Forsythiae fructus*), Magnoliaceae (min. 21 iz *Magnoliae officinalis*), Saururaceae (min. 16 iz *Houttuynia cordata*), s velikom rasprostranjenošću i u porodicama Acanthaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae i dr. (Fu i sur., 2018; Dong i sur., 2017; Luo i sur., 2019; Ma i sur., 2016).

Osnovnu kemijsku strukturu čini 2-fenil-etanol vezan za aldohexozu na C-1 poziciji (uglavnom β -glukopiranozu, a u rijetkim slučajevima alozu), a koja je najčešće esterificirana nekom fenolnom kiselinom (npr. kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska). Dodatno, na aldohexozu vezane su još jedna, dvije ili više aldohexozosa poput glukoze, ramnoze, galaktoze, i/ili aldopentoza poput arabinoze, liksoze i ksiloze (skupine R_4 i R_1), dok je 2-fenil-etanol često funkcionaliziran hidroksilnim skupinama (skupine R_6 i R_7). Posljedično, feniletanoidni glikozidi posjeduju izražen hidrofilni karakter koji im omogućava topljivost u vodi i u relativno polarnim organskim otapalima.



Slika 4. Osnovna kemijska struktura feniletanoidnih glikozida.

Veliki broj varijacija kemijskih struktura feniletanoidnih glikozida primarno je uvjetovan različitošću prisutnih šećernih komponenti i njihovom kiralnošću. Postepenim razvojem i integracijom postupaka izolacije, pročišćavanja i naprednih analitičkih tehnika, omogućena je precizna podjela feniletanoidnih glikozida, obzirom na prisutne šećere i promjene u osnovnoj kemijskoj strukturi, na monosaharidne, disaharidne, trisaharidne i tetrasaharidne, acetilirane, sekoiridoidne i one s baznim šećerom osim glukoze u osnovnoj strukturi (Fu i sur., 2008). U Tablici 6 prikazana je podjela feniletanoidnih glikozida s najpoznatijim primjerima za svaku strukturnu skupinu.

Tablica 6. Podjela feniletanoidnih glikozida (FeG) obzirom na broj monosaharidnih jedinica i aglikonski dio (Fu i sur., 2008; Agar i Cankaya, 2020)

| Skupina | Glikon | Aglikon | Primjeri |
|--|---|--|--|
| <i>monosaharidni FeG</i> | Glc | OH-2-fenil-etanol-R ₁ | salidrozyd kalceolariozyd A kalceolariozyd B kalceolariozyd D |
| | Glc | 1-hidroksi-4-okso-2,5-cikloheksadien | kornozyd eutigozyd B i C rengiozyd A |
| | Glc | R ₁ -cikloheksiletil-R ₂ | rengiozyd B rengiozyd C |
| <i>disaharidni FeG</i> | Rha-Glc | R ₁ -2-fenil-etanol-R ₂ | verbaskozyd izoverbaskozyd, martinozyd, darendozyd B, leukoskeptozyd A kistanozyd C D E i G |
| | Glc-Glc | 2-fenil-etanol-2(OH) | feruginozyd A i B lugrandozid |
| | Rha-Glc | OH-2-fenil-etanol-R | β-hidroksiverbaskozyd |
| | Rha-Glc | 2-fenil-etanol-2(OH)+ 1,4-dioksan | krenatozyd izokrenatosid |
| | Rha-Api | OH-2-fenil-etanol | darendozyd A |
| <i>trisaharidni FeG</i> | X-Glc-Rha- supstitucija na C-6 poziciji Glc | OH-2-fenil-etanol-R | ehinakozyd poliumozid teupoliozyd forzitozyd B stahizozyd A angorozyd A, B i C |
| | X-Glc-Rha supstitucija na C-2 poziciji Glc | OH-2-fenil-etanol-R | ehrenozyd lagotozyd |
| | X-Rha-Glc supstitucija na C-2 poziciji Rha | OH-2-fenil-etanol-R | teukriozyd leonozyd A i B lavanduliofoliozyd flinozyd A, B, C, D i E |
| | X-Rha-Glc supstitucija na C-4 poziciji Rha | OH-2-fenil-etanol-R | rozikazid A |
| <i>tetrasaharidni FeG</i> | X-X-X-Glc | 2-fenil-etanol-2(OH) | trihozantozyd B |
| <i>acetilirani FeG</i> | Acetilirani supstituirani šećeri | OH-2-fenil-etanol-R | videmanozyd A, B, D i E |
| <i>FeG s baznim šećerom osim Glc</i> | All-n(X) | 2-fenil-etanol-2(OH) | magnolozyd A, B i C |
| <i>sekoiridoidni FeG</i> | sekoiridoidna grupa vezana za bazni šećer | 2-fenil-etanol-2(OH) | oleoverbaskozyd |

Glc-glukoza; Rha-ramnoza; Api-apioza; All-aloza

Prema podacima iz WoS-a, do 5. lipnja 2024. objavljeno je najmanje 1759 znanstvenih radova na temu feniletanoidnih glikozida (ključne riječi: *phenylethanoid glycoside*, *phenylpropanoid glycoside*), a od kojih je najistraženiji verbaskozid (1368 i 942 radova s ključnim riječima verbascoside, odnosno *syn. acteoside*), slijedi ga ehinakozyd s 478 rada, dok su primjerice, neki manje zastupljeni feniletanoidni glikozidi poput poliumozida, teupoliozida ili stahizozida A spomenuti tek u 52, 13, odnosno 8 znanstvenih radova. Farmakološka aktivnost ovih polifenolnih spojeva tek se intenzivnije istražuje posljednjih deset godina, a potvrđeni su različiti biološki učinci u *in vitro* i *in vivo* sustavima za feniletanoidne glikozide ili ekstrakte bogate ovim spojevima, poput zaštite od oksidacijskog stresa neutralizacijom O_2^- , OH, H_2O_2 i 1O_2 slobodnih radikala, neuroprotektivnih, hepatoprotektivnih, kardioprotektivnih, antitumorskih, protupalnih učinaka i dr. (Tablica 7).

Tablica 7. Primjeri biološke aktivnosti feniletanoidnih glikozida na *in vitro* te *in vivo* modelima

| Spoj/ekstrakt | Biljni izvor | Biološka aktivnost | Referenca |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|--------------------------------------|
| EHI | / | protuupalni učinak na induciranom kolitisu <i>in vivo</i> | Jia i sur. (2014) |
| EHI | <i>Cistanche deserticola</i> | hepatoprotektivan učinak protiv inducirane GalN/LPS na jetri <i>in vivo</i> | Li i sur. (2014) |
| VERB | / | <i>anti age</i> učinak u stimulaciji limfocita <i>in vivo</i> | Chen i sur. (2020) |
| pročišćena smjesa | <i>Forsythia koreana</i> | antioksidacijski i neuroprotektivni učinak na HT22 staničnoj liniji | Yeong-Geun i sur. (2018) |
| SAL, EHI, VERB i izo-VERB | / | antioksidacijska zaštita protiv inducirane citotoksičnosti PC12 stanica | Li i sur. (2018) |
| SAL | / | antikancerogena aktivnost na staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura i humane stanične linije karcinoma dojke MCF-7 | Gang i sur. (2015); Li i sur. (2018) |
| EHI, VERB i TUB B | <i>Cistanche salsa</i> | analgetički učinak <i>in vivo</i> | Kartbaeva i sur. (2017) |
| pročišćena smjesa | <i>Cistanche deserticola</i> | imunomodulatorni učinak na dendritskim ćelijama <i>in vivo</i> | Yang i sur. (2016) |
| etanolni ekstrakt (↑[izo]/VERB) | <i>Clerodendrum chinense</i> | antikancerogeni učinak na humanim stanicama adenokarcinoma pluća A549 | Chittasupho i sur. (2023) |
| metanolni ekstrakt / teupoliozid | <i>T. chamaedrys</i> | antikancerogeni i antioksidacijski učinak na mišjim stanicama melanoma | Prucoli i sur. (2024) |
| FRZ A | / | antiupalni učinak na epitelnim stanicama pluća i debelog crijeva <i>in vitro</i> te <i>in vivo</i> | Wang i sur. (2023) |
| POLI | <i>Callicarpa kwangtungensis</i> | protektivni učinak protiv osteoporoze inducirane dijabetesom tipa 2 kroz inhibiciju ferroptoze na T2DOP mišjem staničnom modelu | Xu i sur. (2024) |
| metanolni i vodeni ekstrakt (VERB) ↑ | <i>Stachytarpheta indica</i> | antibakterijski učinak protiv <i>Staphylococci</i> spp., regeneracija tkiva | Agampodi i sur. (2022) |

EHI-ehinakozyd; VERB-verbaskozid; SAL-salidrozyd; TUB B-tubulozyd B; TEU-teukriozyd; FRZ A- forzitozyd A; POLI-poliumozid

2.2.1.1.1. Stabilnost i biodostupnost

Obzirom na prisutnost velikog broja hidroksilnih skupina, esterskih i glikozidnih veza te mogućnosti *cis-/trans* konformacije acilnih i glikozilnih grupa, feniletanoidni glikozidi su podložni degradaciji pri izlaganju svjetlu, višim temperaturnim režimima i lužnatom pH (Wu i sur., 2020). Zhou i sur. (2017) analizirali su stabilnost ukupnih feniletanoidnih glikozida ekstrahiranih u vodi iz *Osmanthus fragrans* te su odredili značajnu degradaciju tijekom vremena. Udjel analiziranih feniletanoidnih glikozida smanjio se za 87 % pri 50 °C kroz 90 dana, pri čemu je sličan degradativni učinak primijećen pri 80 °C kroz samo 7 dana (84 %). Potvrđen je i značajan učinak povišenja pH vrijednosti na stupanj degradacije. Nadalje, verbaskozid je u potpunosti degradiran pri neutralnom pH kroz dva tjedna pri sobnoj temperaturi, dok je 27 % početnog udjela očuvano kroz 60 dana pri sobnoj temperaturi, u mraku i pri pH=5 (Vertuani i sur., 2011). Primijećena je izomeracija verbaskozida u izoverbaskozid prilikom pripreme biljne infuzije, dok je pri uvjetima pasterizacije parom kroz 150 s ostao u potpunosti očuvan (Wong i sur., 2001; Arthur i sur., 2011). NMR analizom primijećena je i moguća metilacija i hidroliza ehinakozida čuvanog u metanolu obzirom na detekciju verbaskozida i kistanozida A, kao i transformacija *cis-/trans* konfiguracije unutar kafeoil grupe (Yan i sur., 2018). Potvrđena je i stabilnost feniletanoidnih glikozida u tinkturama (80 % očuvanosti nakon 6 mjeseci), a što je vjerojatno posljedica slabe kiselosti samog medija (Karioti i sur., 2011).

Osim utvrđivanja bioloških učinaka i njihovih mehanizama, farmakološka istraživanja također su usmjerena na analizu biodostupnosti polifenolnih spojeva. Biodostupnost (*eng. bioavailability*) je termin koji obuhvaća više faza: i) unos aktivnih komponenti u samostalnom, „nezaštićenom“ obliku ili u formi prehrambenog ili nekog drugog zaštitnog matriksa, ii) otpuštanje promatranog aktivnog spoja iz izvornog matriksa (prehrambenog, zaštitne kapsule ili nečeg sličnog), iii) probavu aktivnog spoja u gastrointestinalnim uvjetima, iv) apsorpciju te v) metabolizam i eventualno skladištenje aktivne komponente. Prema navedenome, biodostupnost objedinjuje bioraspoloživost (*eng. bioaccessibility*), kao sumu procesa probave i apsorpcije promatrane komponente u intestinalnom traktu, te bioaktivnost (*eng. bioactivity*) kao skup procesa transporta aktivne komponente do tkiva, asimilaciju, biomolekularne interakcije i konačan fiziološki, odnosno biokemijski učinak na promatrani modelni sustav (Fairweather-Tait, 1993; Fernández-García i sur., 2009; Cardoso i sur., 2015). Upravo je pronalazak rješenja vezanih za zaštitu polifenola od ekstremnih gastrointestinalnih uvjeta te njihovu kontroliranu

dopremu u nativnom obliku jedan od ključnih koraka za poboljšanje bioraspoloživosti, i posljedično, maksimalizaciju bioaktivnih učinaka.

Dosad provedena istraživanja na području biodostupnosti feniletanoidnih glikozida upućuju na značajne izazove u pogledu njihove bioraspoloživosti i apsorpcije. Primjerice, za verbaskozid, salidrozyd, izoverbaskozid i ehinakozid utvrđena je slaba apsorpcija u Caco-2 stanicama, uglavnom putem pasivne difuzije. Zabilježena je relativno brza apsorpcija verbaskozida i izoverbaskozida (30 minuta u *in vitro* uvjetima), ali s vrlo niskom bioraspoloživošću ($F=0,1-0,2$ %) (Gao i sur., 2015; Zhou i sur., 2018). Na modelu štakora također je utvrđena vrlo brza apsorpcija verbaskozida putem oralne administracije (20-80 mg kg⁻¹), no s vrlo niskom maksimalnom koncentracijom analiziranom u serumu ($c_{\max}=162-624$ mg mL⁻¹ redosljedom primijenjene koncentracije) i F (0,98-1,11 %) (Wen i sur., 2016). Za ehinakozid je utvrđena mogućnost prolaska kroz intestinalnu barijeru, no s niskom efikasnošću apsorpcije i niskim F (0,83 %) (Jia i sur., 2006; Matthias i sur., 2004). Vrlo niska bioraspoloživost detektirana je i za poliumozid ($F=0,69$ %) i forzitozid ($F=0,5$ %) (Wang i sur., 2010; Qian i sur., 2016). Za razliku od brze, ali niske apsorpcije prethodno spomenutih feniletanoidnih glikozida, kod salidrozida je nakon administracije i oralnim putem i kaniliranjem utvrđena brza i vrlo efikasna apsorpcija, sa c_{\max} oko 20 puta većom u odnosu na ehinakozid i verbaskozid (Chang i sur., 2007; Yu i sur., 2008).

Osim apsorpcije, važni su i metabolički procesi koje feniletanoidni glikozidi prolaze obzirom na kemijsku strukturu, poput hidrolize, hidroksilacije, sulfatacije, glukuronidacije, acetilacije, metilacije, deglikozilacije i dr. te niza biotransformacija pod utjecajem crijevne mikrobiote pri čemu se stvara veliki broj degradacijskih metabolita (Wu i sur., 2020). Premda su kafeinska kiselina, dihidrokafeinska kiselina, hidroksitirozol i *m*-hidroksifenilpropionska kiselina najčešći metaboliti, njihov broj znatno varira ovisno o strukturnoj specifičnosti. Primjerice, verbaskozid se biotransformira u čak 14 mogućih metabolita (Cui i sur., 2016), dok su za forzitozid A zabilježena tek tri metabolita (Xing i sur., 2014). Značajan utjecaj ima i sinergistički učinak drugih aktivnih komponenti u matriksu. Tako je u istraživanju Tanino i sur. (2015) utvrđena poboljšana apsorpcija verbaskozida i ehinakozida za otprilike tri puta u prisutnosti ekstrakta iz *Cistanche tubulosa* bogatog polifenolima u odnosu na pojedinačno administrirane spojeve. Poboljšani farmakokinetički parametri određeni su i kod uvođenja ekstrakta *Rhodiola crenulata* pri oralnoj administraciji salidrozida (46,2 mg kg⁻¹) (Zhang i sur., 2008).

Istraženi su i određeni pristupi poboljšanja biodostupnosti i apsorpcije feniletanoidnih glikozida *in vivo*, poput dodatka biljnih ulja klinčića (Shen i sur., 2015), polisaharida (Fu i sur., 2020), ali i primjene inkapsulacijskih tehnika (Molaveisi i sur., 2022).

2.2.2. *Biološka aktivnost trave ive*

Uz provedene fitokemijske studije, znanstvena istraživanja usmjerena su prema određivanju različitih bioloških učinaka ekstrakta trave ive, a kojima bi se potvrdili određeni terapijski učinci njene primjene. Poznato je da ekstremniji klimatski uvjeti poput sušnih i sunčanih razdoblja s naglaskom na pojačanu UVB radijaciju (Mediteran, kontinentalni dio Balkanskog poluotoka) te osiromašeno tlo stimuliraju sintezu sekundarnih metabolita samoniklog ljekovitog bilja, tako stvarajući prirodnu zaštitu i otpornost na različite abiotičke stresore (Myagmar i Aniya, 2000; Jarić i sur., 2015). Sekundarni metaboliti definiraju se kao nenutritivni kemijski spojevi koji imaju sposobnost modulacije i/ili stimuliranja određenih biokemijskih procesa, djelujući tako pozitivno ili pak negativno na jednu ili više bioloških funkcija. Neki od najpoznatijih primjera su polifenolni spojevi, terpenoidi, spojevi dušika i sumpora poput alkaloida, glukozinolata, cijanogenih glikozida i dr. Generalno, biološka aktivnost ovisi o intrinzičnim svojstvima i dozi odnosno koncentraciji testiranih sekundarnih metabolita (Chandrasekaran i sur., 2018).

Obzirom na dokazanu prisutnost antioksidansa poput polifenolnih spojeva i eteričnih ulja kao biološki aktivnih spojeva, dostupna istraživanja uglavnom su bazirana na testiranju određenih bioloških učinaka različito pripremljenih ekstrakata trave ive na *in vitro* staničnim modelima, modelnim makromolekulama i mikrobnim kulturama.

Antiproliferativna i citotoksična aktivnost metanolnog ekstrakta trave ive istraživana je u radu Stanković i sur. (2011a) na staničnoj liniji humanog karcinoma debelog crijeva HCT-116 u koncentracijskom rasponu od 50-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i tijekom 24 i 72 sata koristeći dvostruko fluorescentno bojenje pomoću AO/EB (akridin narančasti/etidij bromid) fluorescentnog bojenja tretiranih stanica te MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) testa. Utvrđen je značajan citotoksični učinak na testirane stanice nakon 24 sata pri $\text{IC}_{50}=1,08 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, uzimajući u obzir kriterije za citotoksičnost Američkog nacionalnog instituta za rak pri čemu je $\text{IC}_{50} < 30$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ službena minimalna koncentracija za citotoksični učinak biljnih ekstrakata. Nadalje, uočen je i antiproliferativni učinak pri koncentraciji od 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kao posljedica indukcije apoptoze stanica, a što je i potvrđeno detekcijom morfoloških promjena stanica. Potvrđeno je i značajno antioksidacijsko djelovanje svih primijenjenih koncentracija

smanjenjem generiranja superoksid anion radikala i nitrita nakon 72 sata tretmana. U drugom radu Stankovića i sur. (2015), testirane su stanične linije humanog adenokarcinoma cerviksa (HeLa), humanog melanoma (Fem-x), humane kronične mijelogene leukemije (K562) i humanog adenokarcinoma dojke (MDA-MB-361) u koncentracijskom rasponu od 12,5-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Usporedno s pozitivnom kontrolom, MTT testom određen je visok potencijal citotoksičnosti na K562 tumorskoj staničnoj liniji kroz 72 sata tretmana, reducirajući tako preživljenje stanica za čak 97 %. Ekstrakt trave ive pokazao je selektivno djelovanje prema tumorskim stanicama, obzirom da je smanjio rast normalnih humanih krvnih mononuklearnih stanica stimuliranim mitogenim fitohemaglutininom (PHA-PBMC) za samo 20 % pri 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok pri nižim koncentracijama nije bilo citotoksičnog učinka. Značajna citotoksična aktivnost ekstrakta trave ive ($\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g mL}^{-1}$) određena je i na staničnim linijama humanog karcinoma cerviksa (Hep2c, $\text{IC}_{50}=34,35 \mu\text{g mL}^{-1}$), humanog rabdiosarkoma (RD, $\text{IC}_{50}=13,45 \mu\text{g mL}^{-1}$) i mišjeg fibroblasta (L2OB, $\text{IC}_{50}=18,37 \mu\text{g mL}^{-1}$) u radu Vujanović i sur. (2019). Proapoptički i citotoksični učinak također je istraživan na staničnim linijama humanog karcinoma dojke (MDA-MB-231) i humanog karcinoma debelog crijeva (SW-480) u radu Nikodijevića i sur. (2016). Analizirane su koncentracije ekstrakta trave ive od 1, 10, 50, 100, 250 i 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom tretmana od 24 i 72 sata. Ispitivani metanolni ekstrakt pokazao je dozno i vremenski ovisni učinak, s naglaskom na visoku potentnost najveće primijenjene koncentracije u inhibiciji rasta SW-480. Ekspimirani citotoksični učinak povezan je s pojavom procesa apoptoze, i slabije izraženom nekrozom stanica za obje ispitivane stanične linije, pri čemu je učinak bio izraženiji nakon 72 sata. Dokazana je i povećana ekspresija Fas proteinskog receptora odgovornog za inicijaciju puta apoptoze kod MDA-MB-231, a što nije slučaj kod SW-480, čime se može objasniti značajniji citotoksični, odnosno proapoptički učinak ekstrakta trave ive na MDA-MB-231.

Protuupalni potencijal na modelnom sustavu proteina te *potencijal inhibicije enzima α -glukozidaze* za redukciju povećane razine glukoze u krvi testiran je u radu Sailović i sur. (2024). Etanolni ($\text{IC}_{50}=58,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) i acetonski ($\text{IC}_{50}=44,82 \mu\text{g mL}^{-1}$) ekstrakti pokazali su najizraženiju protuupalnu aktivnost, kao i inhibitornu aktivnost ($\text{IC}_{50 \text{ EtOH}}=32,54 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\text{IC}_{50 \text{ Ac}}=31,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) na testiranom enzimu, a što je u radu korelirano i s određenim višim vrijednostima TPC-a i ukupnih flavonoida u odnosu na vodeni ekstrakt najslabije izraženog potencijala na testirane parametre.

Protektivni učinak modelnih makromolekula proteina (goveđi albumin) i lipida (linolna kiselina) obzirom na prisutnost vodenog i metanolnog ekstrakta trave ive analiziran je mjerenjem inhibicije karbonilacije proteina kroz 1 i 24 sat pri 167 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te oksidacije lipida

pri koncentracijama od 0,01 i 0,1 mg mL⁻¹ (Bektašević i sur., 2023), usporedno s askorbinskom kiselinom, butil hidroksianizol i butil hidroksitoluen. Inhibicija lipidne peroksidacije bila je više izražena kod tretmana vodenim ekstraktom, neovisno o dozi (52,47-58,79 %), nego kod metanolnog ekstrakta (34,82-39,58 %). Oba ekstrakta pokazala su se djelotvornima u inhibiciji karbonilacije proteina kroz 1 sat (8,49-11,11 %) poput standardnog antioksidansa butil hidroksitoluena (11,12 %), dok je tretman od 24 sata rezultirao prooksidacijskim učinkom.

Inhibicija acetilkolinesteraze (AChE) ekstraktom trave ive određivana je Ellmanovom metodom u istraživanjima Vladimira Kneževića i sur. (2014) te Bektaševića i sur. (2023). Testirane koncentracije u prvom spomenutom radu bile su 0,25, 0,50 i 1 mg mL⁻¹, usporedno s galantaminom kao pozitivnom kontrolom, te je određen dozno ovisni učinak etanolnog ekstrakta, s najvećim inhibitornim potencijalom pri 1 mg mL⁻¹ (> 80 %), a što ukazuje na moguće neuroprotektivno djelovanje ekstrakta. Autori su povezali spomenuti učinak s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta, koji su posljedica malog udjela detektiranih ukupnih hidroksicimetnih kiselina (15,11 mg ekvivalenata ružmarinske kiseline g⁻¹ s. tv. ekstrakta), ali upućuju na prisutnost drugih psojeva aličnih učinaka koji nisu detektirani. Međutim, rezultati istraživanja Bektašević i sur. (2023) ukazali su na vrlo nizak do nepostojeći inhibitorni učinak vodenog (27,77 % i 4,30 %) i metanolnog ekstrakta (10,05 % i 0 %) u koncentraciji od 45 µg mL⁻¹ na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze, usporedno s eserinom kao pozitivnom kontrolom pri 100 µg mL⁻¹ (95,92 % i 78,12 %).

Antimikrobna aktivnost ekstrakta trave ive analizirana je putem disk difuzijske metode mjerenjem zone inhibicije rasta testiranih bakterijskih kultura i kultura plijesni (Vuković i sur., 2007) ili određivanjem minimalne inhibitorne, odnosno mikrobicidne koncentracije ekstrakta Stanković i sur., 2012b; Sailović i sur., 2024). Značajna antimikrobna aktivnost zabilježena je na gram negativnim bakterijama *Azotobacter chlorococcum* (zona inhibicije: 28 mm) i *Klebsiella pneumoniae* (zona inhibicije: 22 mm), usporedno s kontrolom amracinom (32 mm i 35 mm). Prema Stankoviću i sur. (2012b), acetonski, etil acetatni i metanolni ekstrakti trave ive pokazali su jače antibakterijsko nego antifungalno djelovanje. Uspoređujući s pozitivnom kontrolom amoksicilinom (MIC/MMC: 0,24 µg mL⁻¹ i > 500 µg mL⁻¹), svi ekstrakti pokazali su najjače inhibitorno djelovanje prema *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MIC/MMC: 0,15-0,3 mg mL⁻¹). Sailović i sur. (2024) također su utvrdili jače antibakterijsko nego antifungalno djelovanje ekstrakta trave ive, pri čemu je vodeni ekstrakt pokazao učinkovitije djelovanje obzirom na manje potrebne koncentracije za inhibicijski učinak (MIC) (Tablica 8).

Tablica 8. Antimikrobna aktivnost ekstrakta trave ive (Stanković i sur., 2012b; Sailović i sur., 2024)

| Mikrobna kultura | <i>H₂O_E</i> | | <i>MetOH_E</i> | | <i>EtOH_E</i> | | <i>Ac_E</i> | | | <i>EtylAc_E</i> | | |
|-----------------------------------|-------------------------|------|----------------|------|---------------|------|-------------|------|------|-----------------|-----|-----|
| | MMC | MIC | MMC | MIC | MMC | MIC | MMC | MIC | | MMC | MIC | |
| <i>Gram-(+)-bakterije</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 10 | 1,25 | 0,3 | 0,15 | 20 | 5 | 20 | 0,15 | 5 | 0,15 | 0,3 | 0,3 |
| <i>S. aureus</i> * | | | 5 | 5 | | | | 10 | | 10 | >10 | >10 |
| <i>B. cereus</i> ATCC 11778 | 20 | 5 | | | 20 | 2,5 | 20 | | 2,5 | | | |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 6633 | 5 | 1,25 | | | 20 | 2,5 | >20 | | 1,25 | | | |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 25922 | >5 | 5 | | | 20 | 5 | 20 | | 5 | | | |
| <i>Gram-(-)-bakterije</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 5 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 20 | 10 | 5 | 10 | >10 | >10 |
| <i>E. coli</i> * | | | 5 | 5 | | | | 20 | | 20 | >10 | >10 |
| <i>P. vulgaris</i> ATCC 27853 | 2,5 | 2,5 | | | 20 | 2,5 | >20 | | 2,5 | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 2,5 | 2,5 | | | 5 | 2,5 | >20 | | 2,5 | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | | | 5 | 2,5 | | | | >20 | | 5 | >10 | 10 |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 | 1,25 | 1,25 | | | 10 | 1,25 | 20 | | 1,25 | | | |
| <i>Plijesni</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 2091 | 5 | 5 | | | 20 | 5 | 20 | | 5 | | | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | | | >20 | >20 | | | | >20 | | >20 | >10 | >10 |
| <i>C. albicans</i> * | | | >20 | >20 | | | | >20 | | >20 | >10 | >10 |
| <i>A. niger</i> | 2,5 | 2,5 | >20 | >20 | 20 | 2,5 | 20 | >20 | 2,5 | >20 | >10 | >10 |
| <i>Penicillium</i> sp. | 1,25 | 1,25 | | | 20 | 2,5 | 20 | | 2,5 | | | |

H₂O_E-vodeni ekstrakt; MetOH_E-metanolni ekstrakt; EtOH_E-etanolni ekstrakt; Ac_E-acetonski ekstrakt; EtylAc_E-etil acetatni ekstrakt; MMC-minimalna mikrobicidna koncentracija u mg mL⁻¹; MIC-minimalna inhibitorna koncentracija u mg mL⁻¹; *klinički izolati

Genotoksični utjecaj ekstrakta trave ive relativno je slabo istražen. Tako su Milošević Đorđević i sur. (2013) prvi i jedini do sada evaluirali genotoksični potencijal metanolnog ekstrakta trave ive analizom frekvencije mononukleusa te određivanjem nuklearnog indeksa diobe (NDI) kao indikatora citostatičnog učinka u uzgojenim ljudskim limfocitima (PBL). Od četiri ispitane koncentracije (125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), samo je najveća koncentracija značajno inducirala povećani broj mikronukleusa, dok je najniža koncentracija značajno smanjila mutageni učinak testirane pozitivne kontrole mitomicina C. Nadalje, studija je ukazala na odsutnost citotoksičnog učinka ekstrakta na limfocite, kao i njegovo značajno smanjenje primjenom ekstrakta u kombinaciji s kemoterapeutikom.

Imunomodulacijski učinak različitih frakcija diklormetanskog ekstrakta trave ive nedavno je istraživan u radu Li i sur. (2023), pri čemu je dokazana potencijalna stimulacija proliferacije limfocita ovisno o testiranim koncentracijama (3,3 i 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), kao i aktivacije CD8^+ stanica te modulacije diferencijacije imunološke memorije T stanica pri određenim koncentracijama.

Osim ekstrakta, proučavan je i antioksidacijski, antimikrobni, antifitoviralni potencijal eteričnog ulja trave ive. Bektašević i sur. (2023) odredili su značajno manju antioksidacijsku aktivnost eteričnog ulja trave ive DPPH (202 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i FRAP (13 $\mu\text{g mL}^{-1}$) metodama, u odnosu na testirani vodeni i metanolni ekstrakt. Vuković i sur. (2007) dokazali su potentnije antibakterijsko djelovanje eteričnog ulja (zona inhibicije rasta=16-29 mm) za osam ispitivanih bakterijskih kultura u odnosu na testirani metanolni ekstrakt. Bezić i sur. (2011) predložili su tretman eteričnim uljem trave ive bogatog germakrenom D (17,2 %), β -pinenom (12,3 %) i β -karofilenom (7,1 %), kao učinkovitim sredstvom za redukciju broja lezija od 44 % kod biljke *Chenopodium quinoa* inficirane patogenim CMV virusom.

2.3. Valorizacija biljnih ekstrakata

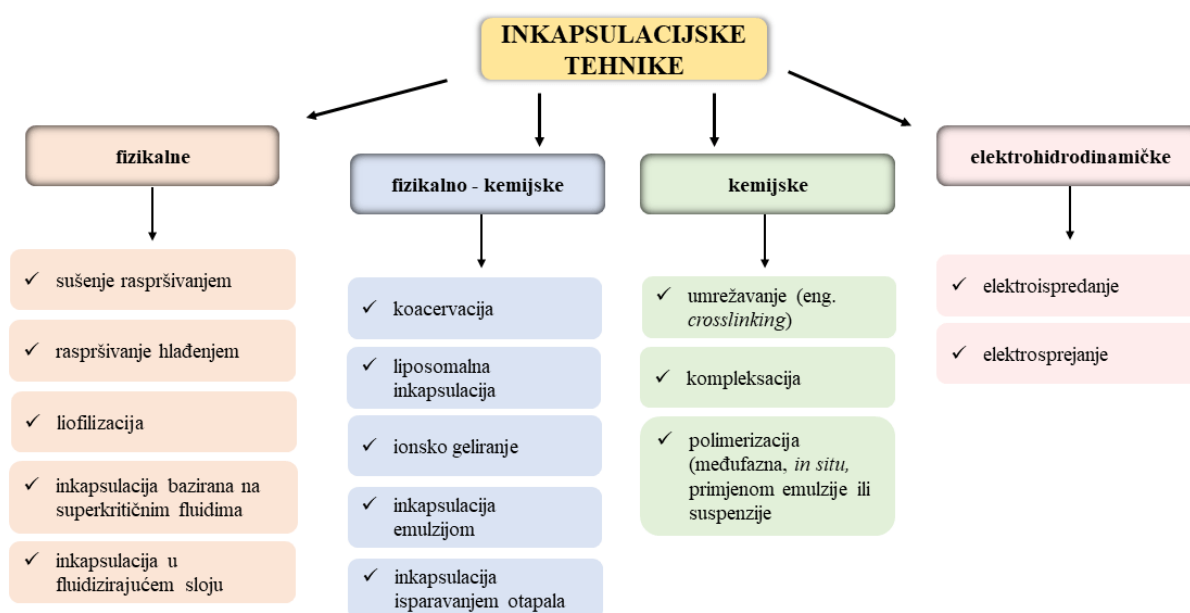
2.3.1. Inkapsulacija

2.3.1.1. Izazovi inkapsulacije polifenola i podjela tehnika

Iako su zahtjevi suvremenog potrošača usmjereni na proširenje asortimana prehrambenih proizvoda obogaćenih bioaktivnim spojevima biljnoga podrijetla, vrlo često njihova fizikalno-kemijska svojstva i tehnološki uvjeti proizvodnje (sklonost oksidaciji i degradaciji pod utjecajem visoke temperature i tlaka, ekstremnih pH vrijednosti, svjetla i sl.) ograničavaju širu primjenu. Polifenoli imaju relativno nisku apsorpciju u probavnom sustavu koja ovisi o njihovoj topljivosti i stabilnosti pri određenim uvjetima probavnog sustava, kemijskoj strukturi, bioraspoloživosti i biodostupnosti, a na koje utječu interakcije između polifenola i prisutnih ugljikohidrata, proteina, lipida i enzima, i sl. (Fang i Bhandari, 2010). Dodatni problem implementacije polifenola u prehrambene proizvode predstavlja i njihov negativan utjecaj polifenola na senzorske karakteristike proizvoda.

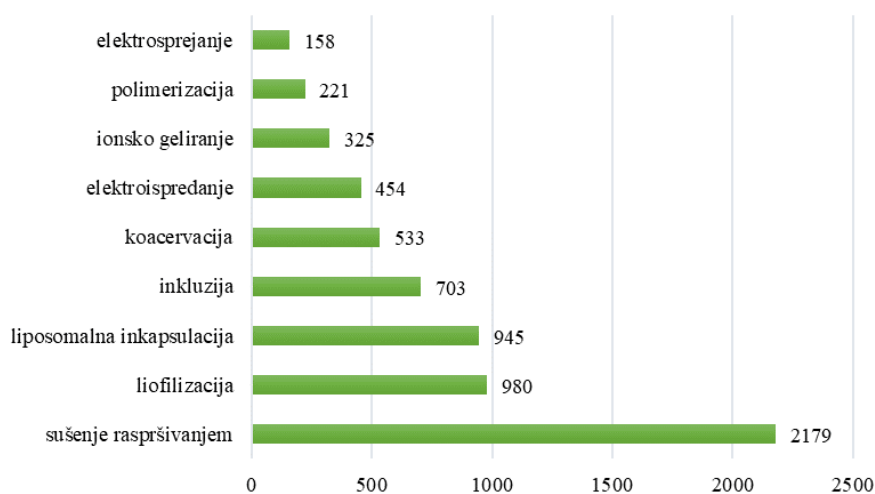
Kako bi se prevladali navedeni izazovi u cilju proširenja komercijalne primjene polifenolnih biljnih ekstrakata u prehrambene proizvode, vrlo često se primjenjuju različite tehnike inkapsulacije. Inkapsulacija se definira kao tehnološki postupak „pakiranja“, odnosno zaštite aktivnih sastojaka korištenjem nosača. Generalno, aktivne komponente mogu se inkorporirati u formi čestica (eng. „*matrix*“) ili kapsula (eng. „*core-shell*“), ovisno o tome da li su aktivne komponente uniformno raspoređene u dozirnom sustavu ili pak čine jezgru inkapsuliranog sustava obloženu slojem primijenjenog nosača. Ovisno o primijenjenoj inkapsulacijskoj tehnici i procesnim uvjetima, mogu se formirati inkapsulirani dozirni sustavi u mikro- (1-1000 μm) ili nanoveličini (Tyagi i sur., 2011; Shishir i sur., 2018). Nanoinkapsulirani sustavi najčešće su različiti morfološki tipovi čestica dobiveni iz nanoemulzija, koloidnih sustava (micele) i molekularnih kompleksa. Tri su ključna koraka za provedbu inkapsulacije, a uključuju: i) pripremu sustava aktivnih supstanci i otapala u tekućem (otopina, suspenzija, emulzija) ili krutom obliku (aglomerati, apsorpcija) ii) dodatno mehaničko procesiranje, ukoliko je potrebno (emulgiranje, aglomeracija, sprejanje), iii) stabilizaciju pripremljenog sustava primjenom koacervacije, polimerizacije, elektrosprejanja/ispredanja i dr. (Poncelet, 2006).

Tehnike formuliranja inkapsuliranih dozirnih sustava najčešće se klasificiraju se na fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske metode i elektrohidrodinamičke obzirom na fizikalne, kemijske i električki inicirane promjene u disperzijama za inkapsulaciju (Slika 5).



Slika 5. Podjela najčešće korištenih inkapsulacijskih tehnika (Dias i sur., 2017).

Interpretacijom dostupnih podataka ekstrahiranih iz WoS znanstvene baze podataka prema pretraživanju odabranih ključnih riječi („polyphenol“, „polyphenolic“, „phenolic“, „food“, „encapsulation“ i odabrana tehnika), vidljivo je da je tehnika sušenja raspršivanjem najistraženija sa > 2000 objavljenih radova i s najvećim trenutnim komercijalnim potencijalom za stabilizaciju bioaktivnih sastojaka u kontekstu prehrambene industrije. Slijede ju tehnike liofilizacije i liposomalne inkapsulacije, dok je najmanje objavljenih radova o primjeni elektrosprejanja (< 158) (Slika 6).



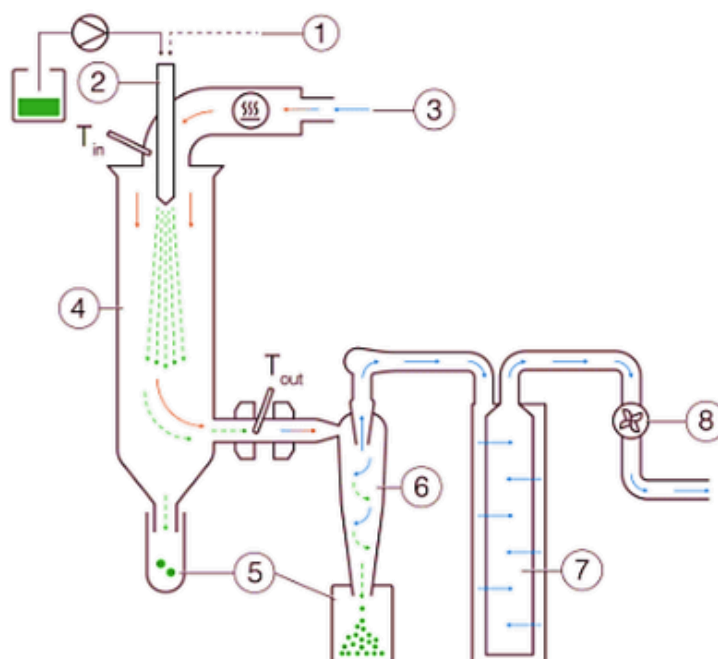
Slika 6. Ukupan broj provedenih istraživanja za najzastupljenije inkapsulacijske tehnike prema WoS bazi (zaključno s 5. lipnja 2024.).

2.3.1.2. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem podrazumijeva tehnološki proces dehidracije atomiziranog fluida (otopine, suspenzije, emulzije ili paste) u struji zagrijanog zraka ili inertnog plina pri čemu se formira suhi prah (Masters, 1997). Tehnologija sušenja raspršivanjem uvedena je prvi put u proizvodnji mlijeka u prahu 1901. godine, a primjena se proširila 1940.-tih i u farmaceutskoj industriji (Masters, 1997). Daljnjim unaprjeđenjem tehnološke izvedbe uređaja, sušenje raspršivanjem postaje nezaobilazna tehnologija u farmaceutskoj, kemijskoj, biotehnološkoj i prehrambenoj industriji za proizvodnju stabilnih praškastih proizvoda (aglomerata, granulata, instant prahova te mikro i nano čestica) i inkapsulacijskih dozirnih sustava obzirom na sljedeće prednosti: a) mogućnost standardizacije finalnog proizvoda i automatizacije procesa, b) prilagodba tehnološkog dizajna obzirom na kapacitet i željene karakteristike praškastog proizvoda, c) primjenjivost na različitim vrstama disperzija, d) ušteda troškova i vremena u usporedbi s liofilizacijom, e) mogućnost razvoja inovativnih i mikrobiološki stabilnih formulacija specifičnih fizikalno-kemijskih karakteristika, f) minimalna degradacija termolabilnih sastojaka (Van Eerdenbrugh i Taylor, 2011). Maksimalno povećanje energetske učinkovitosti i prinosa praha predstavljaju glavne izazove u optimizaciji procesa (Haque i sur., 2015). Ovisno o sastavu otopine i procesnim parametrima, mogu se formulirati prahovi s nanočesticama, mikročesticama i aglomeratima (Jafari i sur., 2008).

Faze vođenja procesa sušenja raspršivanjem uključuju: a) dovod otopine nosača pri konstantnom protoku, b) atomizaciju, tj. raspršivanje otopine u kapljice mili/mikrometarskih veličina pod visokim tlakom, c) trenutnu dehidraciju, tj. isparavanje otapala u konvekcijskom mediju pri zadanoj temperaturi u komori sušionika i d) sakupljanje praha ciklonskim sustavom uz istovremeno odvajanje kondenziranog otapala (Filkova i sur., 2006). Prema navedenom, dijelovi sušionika s raspršivanjem su: peristaltička pumpa, komora za raspršivanje atomizer/raspršivač, ciklon, aspirator, kompresor i prihvatne posude za kondenzat, odnosno prah (Slika 7). Fenomen tehnologije sušenja raspršivanjem zasniva se na uspostavljanju gradijenta prijenosa mase (otapala/vode) između aerosolnih kapljica i konvekcijskog medija, te topline između konvekcijskog medija i aerosolnih kapljica. Gradijent prijenosa mase ostvaruje se uslijed porasta tlaka pare otapala i parcijalnog tlaka otapala prema konvekcijskom mediju, a gradijent prijenosa topline potaknut je visokom temperaturom samog konvekcijskog medija u komori sušionika (Vehring i sur., 2007; Gharsallaoui i sur., 2007). Kinetika sušenja uključuje fazu konstantne brzine i fazu usporene brzine isparavanja. Pri kontaktu zagrijanog medija i aerosolne kapljice, prijenos topline uzrokuje povećanje temperature u kapljici do postizanja

ravnotežne temperature (T_{eq}). Proces sušenja se tako nastavlja konstantnom brzinom isparavanja, odnosno ravnotežnom difuzijom otapala iz kapljice prema površini, održavajući površinu kapljice dovoljno zasićenom i ohlađenom pri temperaturi zasićenja konvekcijskog medija, a što je definirano Pecletovim brojem (Pe) kao omjerom brzine isparavanja i brzine difuzije (Anandharamkrishnan i Ishwarya, 2015). Faza usporavanja kinetike isparavanja započinje pri kritičnoj vrijednosti udjela otapala u čestici/kapljici, odnosno zasićenju konvekcijskog medija. Formira se zaštitna ovojnica na površini gotovo osušene čestice i tako se usporava daljnja difuzija otapala. Istodobno, proces sušenja se nastavlja, ali isključivo pod utjecajem eksterne topline samog medija (nema istodobnog hlađenja medija uslijed egzotermne reakcije isparavanja) pri čemu naglo dolazi do povećanja temperature čestice, tj. njenog dosušivanja. Pri postizanju ravnotežne temperature s konvekcijskim medijem, proces sušenja se završava, a čestice se odvođe u ciklon (Handscomb i sur., 2009).



(1) i (2) Formiraju se aerosolne kapljice iz otopine nosača prolaskom kroz atomizator.
 (3) Ulazi zagrijani zrak u (4) komoru za raspršivanje pri čemu dolazi do transfera mase i topline, odnosno dehidracije. Dio otopine nosača kao gubitak uslijed neefikasne dehidracije sakuplja se u (5) posudici, dok se većinski dio mikročestica odvaja na (6) u prihvatnoj posudi pomoću ciklonskog separatora. Iskorišteni zrak za konvekcijsko sušenje dopreman aspiratorom (8) filtrira se preko (7) izlaznog filtera.

Slika 7. Shema osnovnog principa rada sušionika raspršivanjem (Anonymus, 2024b).

Na iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem i fizikalno-kemijska svojstva dobivenog praha utječu:

1) svojstva otopine nosača

a) izbor i koncentracija nosača

Prilikom dizajna formulacija, važno je odabrati prikladan nosač koji će omogućiti stabilnost otopine nosača, stabilizirati komponente od interesa i poboljšati njihovu biodostupnost u što većoj mjeri (Teja i sur., 2013; Davis i sur., 2016). Intrinzička svojstva polimera određuju potencijalne intermolekularne interakcije između korištenog polimera i komponenata od interesa (Van Eerdenbrugh and Taylor, 2011). Potrebno je u obzir uzeti sljedeća fizikalno-kemijska svojstva polimera: temperaturu staklišta (T_g), molekulsku masu, (ne)ionsku prirodu polimera, vrste funkcionalnih grupa polimera, higroskopnost i topljivost u željenom otapalu (Baghel i sur., 2016). T_g predstavlja prijelaz iz krutog u viskoelastično stanje, karakteristična je za amorfne, biopolimerne materijale te je u kontekstu sušenja raspršivanjem vrlo bitan kriterij za odabir ulazne temperature procesa. Odabirom temperature više od T_g dolazi do depozicije otopine nosača na stijenkama komore sušionika i neželjenih gubitaka (Chokshi i sur., 2008). Udjel nosača na ukupnu masu otopine nosača, njegova molekularna masa i stupanj polimerizacije definiraju viskoznost otopine. Povećanjem koncentracije nosača, povećava se i viskoznost, čime se povećava veličina mikročestica, kao i mogućnost formiranja poroznih i aglomeriranih mikročestica, manje nasipne gustoće prahova, manjeg udjela vlage (Kim i sur., 2003). Manji je i udjel tekuće faze u otopini, a što utječe na kraće vrijeme isparavanja (Suhag i sur., 2016). Reološka svojstva, tj. stupanj viskoelastičnosti također mogu utjecati na uspješnost atomizacije te ujedno i na prinos procesa i morfologiju čestica (Ziaee i sur., 2017).

c) izbor otapala

Hildebrandov parameter topljivosti (δ), odnosno numerički indikator intermolekularnih interakcija tekućine ili čvrste tvari, može poslužiti kao pomoćni alat za odabir jednog ili smjese otapala obzirom na korištene polimere. Generalno, materijali sličnih δ vrijednosti imaju tendenciju učinkovitije mješivosti (Lee i Lee, 2005). Navedeni parametar deriviran je iz entalpije isparavanja (ΔH), Boltzmanove konstante (R), temperature (T) i molarnog volumena (V_m) i pretežito se odnosi na količinu energije potrebne za separaciju jednog mola volumena supstance iz sustava. Površinska napetost, relativna hlapivost i dielektrična konstanta otapala definiraju efikasnost atomizacije otopine nosača i relativnu distribuciju veličine čestica.

Povećanje dielektrične konstante utječe na amorfnost finalnih mikročestica (Ansari i Sunderland, 2008).

2) procesni parametri

a) protok otopine nosača

Protok regulira udjel otapala i suhe tvari unutar komore u jedinici vremena te ga je potrebno uskladiti s protokom atomizirajućeg medija u cilju izbjegavanja formiranja prevelikih raspršenih kapljica koje će utjecati na usporavanje transfera mase i topline, i posljedično, neučinkovito izdvajanje vode, nizak prinos procesa te neželjene fizikalno-kemijske karakteristike prahova (Tonon i sur., 2008).

2b) atomizacija

Raspršivanje otopine nosača značajno utječe na veličinu čestica, odnosno na raspodjelu veličine formuliranih čestica i njihove morfološke karakteristike. *Atomizer* ima ulogu raspršivanja otopine u cilju povećanja specifične površine, odnosno povećanja dinamike transfera mase i topline, a koja je obrnuto proporcionalna primijenjenoj vrsti energije atomizacije (tlačna, vibracijska, kinetička ili centrifugalna) (Masters, 1997; Gharsallaoui i sur., 2007). Postoji više vrsta atomizera prema načinu rada:

Tlačni atomizer koristi tlačnu energiju za rotaciju otopine nosača unutar mlaznice atomizera, pri čemu dolazi do naglog ubrzavanja i konusnog raspršivanja otopine. Ovo je najjednostavnija izvedba atomizera, no bez mogućnosti regulacije veličine raspršenih kapljica.

Dvofluidni atomizer temelji se na homogenizaciji dva fluida, tj. otopine nosača i kinetičke energije komprimiranog fluida unutar ili izvan mlaznice. Omogućuju proizvodnju fino raspršene maglice i manipulaciju otopina velike viskoznosti.

Rotacijski atomizer koristi centrifugalnu silu za ubrzanje otopine nosača na rotirajućem disku. Prednost nad tlačnim atomizerom je mogućnost regulacije akceleracije podešavanjem brzine okretaja diska, čime se optimira stupanj raspršivanja.

Ultrazvučni atomizer iskorištava potencijal ultrazvučnih frekvencija za destabilizaciju fluida i formiranje ultra finih kapljica (Miller, 2016).

Mediji za atomizaciju su komprimirani zrak, CO₂ i N₂, a prilikom odabira, u obzir se uzima gustoća i specifični toplinski kapacitet, kao i željena morfološka obilježja. Generalno, brži transfer mase i temperature ostvaruje se redoslijedom: N₂ < zrak < CO₂, a što je važno u pogledu ekonomičnosti i industrijskoj nadogradnji procesa (Islam i Langrish, 2010).

2c) Ulazna i izlazna temperatura sušenja

Ulazna temperatura (T_u) zagrijanog konvekcijskog medija (najčešće zraka) ima direktan utjecaj na transfer topline i mase tijekom sušenja u komori, a prilagođava se kemijskim karakteristikama nosača s naglaskom na T_g i komponente od interesa (termodegradabilnost, prisutnost šećera i proteina, mogućnost neenzimskih reakcija posmeđivanja i dr.). Generalno, viša T_u promovira bržu dinamiku procesa sušenja, manje gubitke i dobivanje stabilnog proizvoda niske vlage (Ziaee i sur., 2019). Može uzrokovati rupturu na česticama obzirom na visok tlak isparavanja otapala uslijed trenutnog isparavanja otapala ili stvoriti nepropusni površinski sloj. Izlazna temperatura (T_i), tj. njezin pad uslijed endotermne reakcije isparavanja otapala uvjetovana je brzinom isparavanja. Što je veća razlika između T_u i T_i , veća je i brzina sušenja te formiranja čestica (Masters, 1997; Singh i Van den Mooter, 2016).

2d) Kontakt zagrijanog medija i otopine nosača

Kontakt atomiziranih kapljica sa strujom konvekcijskog medija (zraka ili plina) može se postići putem istosmjerne, protusmjerne i kombinirane izvedbe uređaja.

Istosmjerni dizajn omogućuje dovod otopine nosača i zagrijanog medija u istom smjeru čime se maksimizira kontakt otopine i zagrijanog medija s najmanjim udjelom vlage, a tijekom visokog stupnja isparavanja omogućava progresivno sniženje temperature suhog praha koji se putem ciklona odvodi iz komore. Ovakva dinamika procesa ostvaruje relativno velike razlike između T_u (150-220 °C) i T_i (50-80 °C) te je vrlo prikladna za termosenzibilne komponente (Gharsallaoui i sur., 2007).

Protusmjerni dizajn podrazmijeva dovod raspršenih kapljica i zagrijanog medija u suprotnim smjerovima, pri čemu medij najvećeg toplinskog kapaciteta dolazi u kontakt s prahom najmanjeg udjela vlage što može negativno utjecati na očuvanje komponenta od interesa. Stoga se protusmjerni dizajn često kombinira sa istosmjernim u svrhu postizanja maksimalne ekonomske i produktivne učinkovitosti (Gharsallaoui i sur., 2007).

U Tablici 9 sistematizirani su literaturni primjeri inkapsulacija polifenolnih ekstrakata sušenjem raspršivanjem za primjenu u prehrambenoj industriji.

Tablica 9. Literaturni primjeri primjene sušenja raspršivanjem u inkapsulaciji polifenolnih ekstrakata objavljeni u posljednjih pet godina

| Sustav nosača | Uvjeti procesa | Izvor polifenolnog ekstrakta | Cilj/primjena | Referenca |
|---|--|---|--|-----------------------------|
| tragakant guma guma rogača KMC | $T_u=120\text{ °C}$; $T_i=68-71\text{ °C}$ 2 mL min^{-1} , 100 % aspiracije, atomizacija pri 60 L h^{-1} | listovi moringe (<i>Moringa oleifera</i>) | analiza utjecaja nosača na IU, fizikalno-kemijska, termalna svojstva prahova | Castro-López i sur. (2021) |
| proteini sirutke sojini proteini inulin | $T_u=110\text{ °C}$; $T_i=55-65\text{ °C}$ q_{otopine} pri 10 mL min^{-1} | listovi ružmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | praćenje kinetike otpuštanja u GI uvjetima i stabilnosti prahova tijekom skladištenja | Grace i sur. (2021) |
| maltodekstrin arapska guma KG inulin | $T_u=150\text{ °C}$; $T_i=90\text{ °C}$ atomizacija pri 500 mL h^{-1} | cvjetovi hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) | analiza utjecaja nosača na IU te fizikalno-kemijska svojstva prahova | Nguyen i sur. (2022) |
| maltodekstrin HLK | $T_u=120\text{ °C}$; $T_i=80\text{ °C}$ q_{otopine} pri $4,67\text{ mL min}^{-1}$ | plodovi cocone (<i>Solanum sessiliflorum</i>) | analiza utjecaja nosača na IU 5-CQA te fizikalno-kemijska svojstva prahova | Vargas-Muñoz i sur. (2021) |
| maltodekstrin modificirani škrob inulin alginat celobioza | $T_u=140\text{ °C}$; $T_i=66-74\text{ °C}$ 10 mL min^{-1} , 100 % aspiracije, atomizacija pri 473 L h^{-1} | plodovi peruanske jagode (<i>Physalis peruviana</i>) | analiza utjecaja nosača na IU karotenoida te fizikalno-kemijska svojstva prahova, praćenje stabilnosti tijekom skladištenja | Etzbach i sur. (2020) |
| maltodekstrin inulin | $T_u=135-195\text{ °C}$; $T_i=60-90\text{ °C}$ 2 mL min^{-1} , 51 % aspiracije, atomizacija pri 13 L h^{-1} | listovi limunske verbene (<i>Lippia citriodora</i>) | optimizacija procesa primjenom metode odzivnih površina | Leyva-Jiménez i sur. (2020) |
| guar guma mucin ksilan HLK KMC | $T_u=135-195\text{ °C}$; $T_i=60-90\text{ °C}$ 2 mL min^{-1} , 51 % aspiracije, atomizacija pri 13 L h^{-1} | nadzemni dio dobričice (<i>Glechoma hederacea</i>) | analiza utjecaja nosača na IU HC kiselina, fizikalno-kemijska, termalna svojstva prahova te praćenje kinetike otpuštanja u GI uvjetima | Šeremet i sur. (2024) |
| vodotopljivi kitozan | $T_u=115\text{ °C}$; $T_i=58\text{ °C}$ 4 mL min^{-1} , 100 % aspiracije | nadzemni dijelovi gospine trave (<i>Hypericum perforatum</i>) | razvoj kinetičkih modela otpuštanja u vodenom mediju usporedno s modelnim sustavima | Estevinho i sur. (2021) |
| vodotopljivi kitozan | $T_u=115\text{ °C}$; $T_i=58\text{ °C}$ 4 mL min^{-1} , 100 % aspiracije | listovi kadulje (<i>Salvia officinalis</i>) | razvoj kinetičkih modela otpuštanja u vodenom mediju usporedno s modelnim sustavima | Estevinho i sur. (2021) |

KMC-karboksimetil celuloza; KG-glukomanani konjac gume; HLK-djelomično hidrolizirani kolagen; T_u -ulazna temperatura sušenja; T_i -izlazna temperatura sušenja; GI-gastrointestinalni uvjeti; IU-inkapsulacijska učinkovitost; 5-CQA-neoklorogenska kiselina; HC-ukupne hidroksicimne kiseline

2.3.1.3. Elektroispredanje

Začetak koncepta nanotehnologije 1959. godine te daljnji razvoj, uključujući izum pretražnog mikroskopa s tuneliranjem 1986. godine (Gerd Binnig i Heinrich Rohrer, Nobelova nagrada za fiziku), omogućili su progresivna ulaganja u napredne tehnike za proizvodnju širokog spektra visokospecijaliziranih materijala primjenjivih u svim granama industrije.

Tehnika elektroispredanja jedna je od najpoznatijih tehnika za proizvodnju nanovlakana iz polimerne otopine pri visokom naponu, a vođena je elektrohidrodinamičkim fenomenom, odnosno interakcijom ioniziranih molekula i električnog polja u odnosu na okolni fluid (u ovom kontekstu, okolni fluid je tekuća faza otopine). Anton Formhals smatra se začetnikom elektroispredanja, jer je izveo prvu proizvodnju nanovlakana na bazi acetilceluloze 1934. godine (Formhals, 1934). Na osnovu ranijih opažanja Johna Zelenyja, 1960.-ih Geoffrey Taylor proširuje teorijske spoznaje o transformiranju meniskusa polimerne otopine u konusni oblik, kao preduvjeta za elongaciju polimernog mlaza i formiranje nanovlakana (kasnije poznat kao koncept Taylorovog konusa) (Taylor, 1964; Taylor, 1969). Moderna era razvoja ove tehnike bilježi se tek od ranih 1990.-ih pod utjecajem rada Jayesha Doshija i Darella Renekera, dok su 2000.-ih Darell Reneker i Gregory Rutledge, potaknuti izumom pretražnog elektronskog mikroskopa, omogućili konciznije razumijevanje utjecaja različitih parametara u formiranju nanovlakana, plasirajući tako ovu tehniku na vrh znanstvenih interesa (Doshi i Reneker, 1995; Fong i sur., 1999; Rutledge i Fridrih, 2007). U razdoblju od 2010.-2024. (značajan porast od 2010. s 311 objavljenih radova do 2024. s više od 1000 objavljenih radova, ključne riječi u WoS-u: „electrospinning application”), primjetan je značajan porast istraživanja baziranih na mogućim primjenama elektroispredanja u različitim industrijama, s osobitim naglaskom na aplikaciju u biomedicini (regenerativna medicina i tkivno bioinženjerstvo), farmaciji (lijekovi s kontroliranim prijenosom i otpuštanjem funkcionalnih komponenti i sl.), proizvodnji senzora, filtracijskim tehnološkim rješenjima, inženjerstvu okoliša i dr. (Alam i sur., 2023; Altuntuğ Cesur i sur., 2024; Zhang i sur., 2024, Yue i sur., 2023; Kersey i sur., 2023).

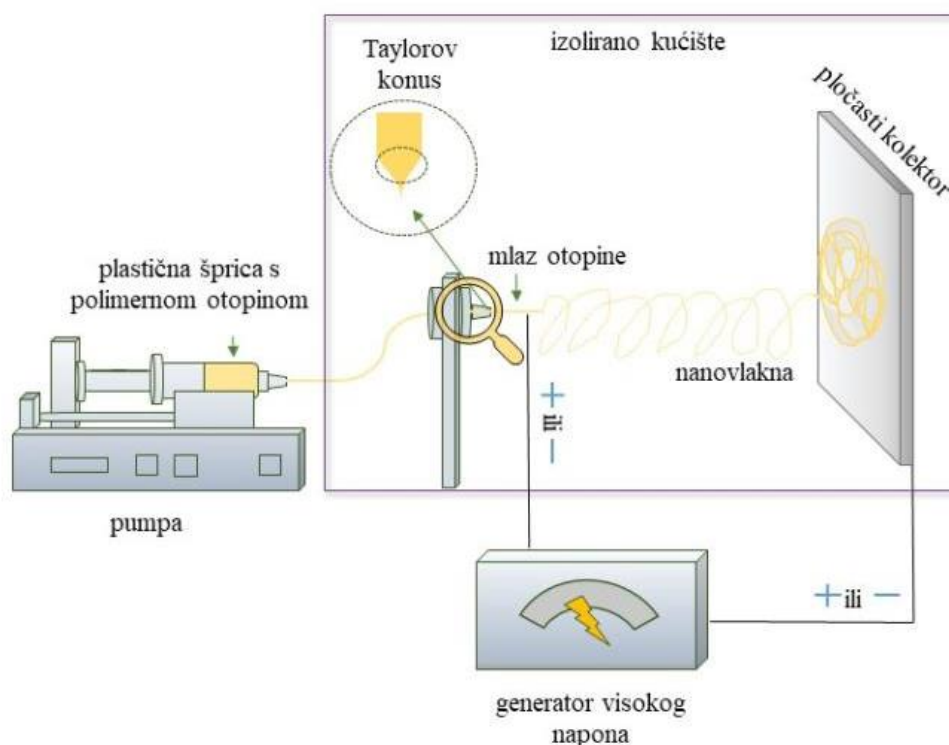
Znanstvena istraživanja vezana za primjenu u prehrambenoj industriji trenutno su usmjerena prema razvoju različitih oblika aktivne ambalaže za produljenje mikrobiološke i senzorske kvalitete proizvoda, dok su istraživanja primjene potpuno biokompatibilnih inkapsuliranih doziranih oblika obogaćenih različitim izvorima biološki aktivnih spojeva namijenjenih direktnoj inkorporaciji u funkcionalne prehrambene proizvode, limitirana (Tablica 10).

Tablica 10. Literaturni primjeri primjene elektroispredanja u prehrambenoj industriji objavljeni u posljednjih pet godina

| Sustav nosača | Uvjeti procesa | Izvor polifenolnog ekstrakta/spoja | Cilj/primjena | Referenca |
|--|---|--|---|------------------------------|
| želatina (40%, w/v) | $d_{\text{igle}}=0,8 \text{ mm}$, 15 kV, 1 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=10 \text{ cm}$ | kora patlidžana (<i>Solanum melongena</i>) | stabilizacija pigmenta, dozirni sustav za obogaćivanje proizvoda | Estrella-Osuna i sur. (2022) |
| PLA/HPMC (12%, w/w) | 16 kV, 1 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=10 \text{ cm}$ | osušeni plod šipka (<i>Punica granatum</i>) | analiza mehaničkih, termalnih i fiz.-kem. svojstava te praćenje kinetike otpuštanja u GI u cilju razvoja aktivne ambalaže | Bodbodak i sur. (2021) |
| PVA (10%, w/v) | 15 kV, 0,5 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=15 \text{ cm}$ | osušeni plod kineske datulje (<i>Ziziphus jujube</i> Mill.) | aktivna ambalaža za očuvanje kvalitete svježih jagoda tijekom skladištenja | Zeinali i sur. (2021) |
| PVA i PVA/EC (15%, w/w) | $d_{\text{igle}}=0,6 \text{ mm}$, 15 kV, 0,25 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=10 \text{ cm}$ | komercijalni ekstrakt <i>Camellie sinensis</i> | aktivna ambalaža za produljenje skladištenja svježeg mesa | Yang i sur. (2021) |
| pululan/proteini sirutke (20%, w/w) | $d_{\text{igle}}=0,8 \text{ mm}$, 15-20 kV, 0,2-0,6 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=15-20 \text{ cm}$ | ekstrakt klinčića | aktivna ambalaža antimikrobnih svojstava | Zambak i sur. (2022) |
| azivash guma/PVA (0,2%/8%, w/w) | 20 kV, 0,5 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=11 \text{ cm}$ | katehini | aktivna ambalaža | Hoseyni i sur. (2020) |
| pululan/proteini sirutke, 1:1, 15, 18 i 21 w/w % | 13-23 kV, 0,6 i 1 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=10 \text{ cm}$ | resveratrol | dozirni sustav za obogaćivanje mliječnog napitka kao modelnog sustava | Seethu i sur. (2020) |
| zein (25%, w/w)/PVP (15%, w/w) „core/shell“ sustav | 18 kV, protok za omotač: 5 mL min^{-1} , protok za jezgru: 5 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=13 \text{ cm}$ | klorogenska kiselina | aktivna ambalaža antimikrobnih svojstava | Wang i sur. (2022) |
| pululan/ksantan guma (20%/1,5%) | $d_{\text{igle}}=0,6 \text{ mm}$, 20 kV, 1 mL min^{-1} , $U_{\text{kolektora}}=15,5 \text{ cm}$ | vitamin C | dozirni sustav/aktivna ambalaža | Cheng i sur. (2024) |

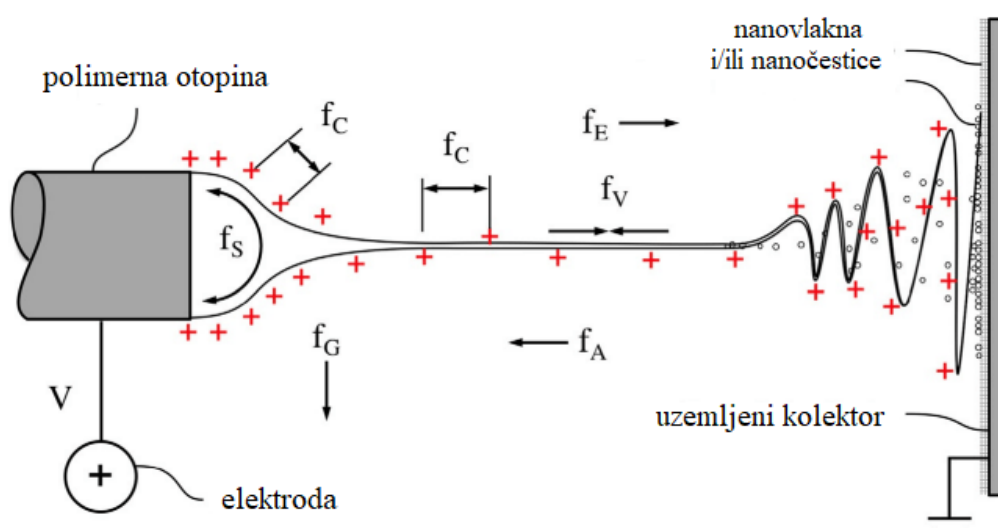
$U_{\text{kolektora}}$ -udaljenost između vrha i kolektora; PLA-polilaktična kiselina; HPMC-hidroksipropilmetil celuloza; PVA-polivinil acetat; EC-etil celuloza; PVP-polivinilpirolidon

Uređaj za elektroispredanje sastoji se iz nekoliko dijelova: kolektor kao izvor visokog napona, peristaltička pumpa (broj može varirati ovisno o dizajnu eksperimenta), igla i kolektor formiranih nanovlakana. Najprije se pumpom, pri optimiranom i konstantnom protoku, dovodi polimerna otopina putem plastične cijevi koja povezuje plastičnu špricu s polimernom otopinom i iglu na držaču unutar izoliranog kućišta (Slika 8). Vrh igle prethodno je spojen s dovodom visokog napona. Uključenjem generatora i uspostavljanjem napona, generira se električno polje između vrha igle i kolektora određene jakosti. Ukoliko se primijeni napon iznad kritične vrijednosti, tj. ukoliko se uspostavi dovoljno jaka razlika potencijala između polimerne otopine i kolektora, kao i dovoljno jake odbojne sile na površini kapljice pod utjecajem visokog napona, prevladava se površinska napetost otopine i dolazi do „rastezanja“ kapljica otopine, tj. deformacije sfernog oblika kapljice u konusno oblikovanu strukturu, poznatiju kao Taylorov konus. Formiranje konusa prati: stvaranje naelektriziranog mlaza, elongacija i ubrzanje mlaza prema kolektoru do 600 m s^{-2} i destabilizaciju, odnosno savijanje mlaza u obliku zavojnica pod utjecajem perturbacija tijekom leta. Uslijed povećanja površine, dolazi do ubrzanog isparavanja otapala, a prolongirani polimer solidificira se na kolektoru u obliku nanovlakana (Hou i Reneker, 2004; Long i sur., 2018).



Slika 8. Osnovni dijelovi sustava za elektroispredanje.

Jedan od ključnih preduvjeta za prijelaz polimerne kapljice na vrhu igle u stabilan i izdužen mlaz je neutralizacija Rayleighove nestabilnosti. Naime, pojavu Plateau-Rayleighove nestabilnosti objašnjava fenomen formiranja kapljica prilikom raspršenja fluida kao posljedicu intrinzičke površinske napetosti fluida i tendencije zauzimanja što manje površine prilikom raspršenja. Ukoliko su viskoelastične sile (f_V) u otopini dovoljno jake da stabiliziraju navedeni fenomen, umjesto formiranih kapljica generira se prolongirani mlaz polimernih lanaca određenog stupnja asocijacije (Slika 9). Uz f_V , formiranje polimernog mlaza određeno je utjecajem Coulombove sile (f_C), sile električnog polja (f_E), površinske napetosti (f_S) te, manje bitnom, silom otpora zraka (f_A) i gravitacijskom silom (f_G) (Feng, 2003; Ramakrishna i sur., 2005).



Slika 9. Odnos između Coulombove sile (f_C), sile električnog polja (f_E), viskoelastičnih sila (f_V), površinske napetosti (f_S), sile otpora zraka (f_A) i gravitacijske sile (f_G) koje istovremeno djeluju na polimernu otopinu primjenom visokog napona (Reneker i sur., 2000).

Prema razvijenom konceptu utjecaja sila na stvaranje polimernog mlaza (Reneker i sur., 2000), f_C i f_E potiču formiranje mlaza, dok ga sile f_V i f_S suprimiraju, odnosno teže stvaranju protumlaza. Primjerice, ukoliko je $f_V > f_S$, uz istovremeno zadovoljenje f_C i f_E , formirat će se nanovlakana, dok u suprotnoj situaciji, dolazi do stvaranja nanočestica (Yu i sur., 2006). Zaključno, međusobni relativni odnos svih spomenutih sila definira morfološka svojstva nanomaterijala proizvedenih elektrohodinamičkom tehnikom.

Čimbenici koji simultano utječu na manju ili veću uspješnost procesa elektroispredanja, kao i na željenu morfologiju nanovlakana, klasificiraju se u tri skupine (Ramakrishna i sur., 2005):

- 1) *intrinzična svojstva polimerne otopine*
 - 2) *procesni parametri*
 - 3) *ambijentalni parametri*
- 1) *intrinzična svojstva polimerne otopine*

Svojstva korištenog otapala, koncentracija i molekularna masa polimera, viskoznost i reološka svojstva, površinska napetost i konduktivnost čimbenici su otopine koje je potrebno uzeti u obzir prilikom optimiranja procesa. Najčešće se koriste različita polarno-protična (voda, etanol, metanol, mravlja kiselina, octena kiselina, trifluoroetanol i dr.), polarno-aprotična (dimetilformamid, diklorometan, aceton, tetrahidrofuran i dr.) i nepolarna otapala poput kloroforma (Tablica 11). Prikladna brzina isparavanja otapala značajno utječe na formiranje suhih nanovlakana, bez suviška vlage, dok prevelika brzina može uzrokovati defekte poput formiranja pora na nanovlaknima, ili suprimirati proces elektroispredanja (Lim i sur., 2019). Prilikom formuliranja polimernih otopina, preporuča se inkorporirati otapalo s relativno visokom dielektričnom konstantom (ϵ) kao mjerom za sposobnost otapala u održavanju elektrostatskih repulzija induciranih električnim poljem, a u cilju poboljšanja distribucije električnih naboja i stabilnosti mlaza (Keirouz i sur., 2023).

Tablica 11. Popis najčešće korištenih otapala za elektroispredanje i pripadajućih fizikalno-kemijskih svojstava

| Otapalo | $T_{\text{vrelišta}}$ (°C) | η pri 25°C (mPa·s) | γ pri 25°C (mN m ⁻¹) | ϵ pri 25°C |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|---------------------|
| octena kiselina | 118 | 1,13 | 26,9 | 6,2 |
| aceton | 56 | 0,33 | 25,2 | 21,0 |
| kloroform | 62 | 0,57 | 26,5 | 4,8 |
| diklorometan | 40 | 0,44 | 27,2 | 9,1 |
| dimetilformamid | 153 | 1,43 | 37,1 | 38,3 |
| etanol | 78 | 1,08 | 21,9 | 24,0 |
| mravlja kiselina | 101 | 1,78 | 37,0 | 58,0 |
| metanol | 65 | 0,60 | 22,3 | 33,0 |
| tetrahidrofuran | 66 | 0,55 | 26,4 | 7,5 |
| trifluoroctena kiselina | 72 | 0,81 | 13,5 | 8,4 |
| trifluoroetanol | 78 | 1,75 | 21,1 | 27,0 |
| voda | 100 | 1,00 | 72,8 | 80,0 |

Za uspješno formiranje polimernog mlaza, vrlo su bitna viskoelastična svojstva otopina definirana molekulskom masom, koncentracijom polimera, viskoznošću i stupnjem asocijacije polimernih lanaca. Povećanje viskoznosti do kritičnog iznosa utječe na veći dijametar nanovakana i bolju uniformnost (Gomez-Estaca i sur., 2012). Premala molekularna masa, kao i koncentracija polimera, uzrokuje nedovoljno intermolekularnih interakcija između molekula, utječući tako na smanjenu viskoznost, dominaciju Rayleighove nestabilnosti, formiranje kapljica umjesto kontinuiranog mlaza i, posljedično, formiranje nanočestica ili nanovlakana s prisutnim nanočesticama. S druge strane, prevelika viskoznost i molekularna masa može inhibirati formiranje Taylorovog konusa i uzorkovati začepljenja igle/mlaznice (Pillay i sur., 2013; Maleki i sur., 2015; Abdullah i sur., 2016).

Površinska napetost otopine primarna je protuteža električnom naboju generiranom pri određenoj jakosti električnog polja (Okutan i sur., 2014). Poželjno je korištenje kombinacije otapala smanjene površinske napetosti jer će trebati primijeniti niže vrijednosti napona za prevladavanje iste, te će stoga i destabilizacija odnosno, deformacija mlaza, biti manja. Poboljšana učinkovitost procesa, kao i smanjenje veličine promjera, može se ostvariti dodatkom surfaktanata (Zeng i sur., 2003). Najčešće korišteni surfaktanti su: natrijev dodecil sulfat (anionski), kopolimeri polietilenoksida i polipropilen oksida (amfoterni), polikvaterni amonijevi ioni, benzalkonij klorid (kationski), te različiti tipovi polisorbata i Triton X-100 (neionski) (Hu i sur., 2015; Stephansen i sur., 2016).

Relativno visoka konduktivnost vrlo je bitan čimbenik pri formiranju Taylorovog konusa obzirom da će prisutnost dovoljne količine naboja, tj. prisutnih repulzija u otopini uzrokovati i učinkovitiju elongaciju mlaza. Time će se smanjiti elektrostatička sila potrebna za pokretanje mlaza. Niska konduktivnost može se korigirati dodatkom soli ili polielektrolita. Pojedina istraživanja upućuju na obrnuto proporcionalan odnos između dijametra nanovlakana i konduktivnosti otopine jer se povećanjem naboja na površini utječe i na stupanj elongacije mlaza. Što je stupanj elongacije veći, veća je i specifična površina generiranih zavojnica tijekom destabilizacije mlaza, tj. tanja su nanovlakna (Ramakrishna i sur., 2005; Feng, 2002; Tan i sur., 2005).

2) procesni parametri

Primijenjeni napon, protok otopine, udaljenost između vrha igle i kolektora, promjer i dizajn mlaznice/igle i tip kolektora imaju ključan utjecaj na morfologiju i dijametar nanovlakana. Minimalni iznos napona (tzv. kritični napon) za formiranje polimernog mlaza neposredno ovisi o površinskoj napetosti polimerne otopine. Primjenjuje se ili pozitivni ili

negativni napon, a za inicijaciju mlaza potrebno je minimalno 6 kV (Taylor, 1964). Pri postizanju napona, smanjenje blizu kritičnog ili pak daljnje povećanje iznad kritičnog može utjecati na redukciju dijametara nanovlakana (Mo i sur., 2004; Zhao i sur., 2004). Preveliki iznos napona korelira s većom mogućnošću pojave vretenastih nanovlakana, tj. globularnih polimernih struktura (Krishnappa, 2003).

Protok otopine direktno ovisi o prethodno navedenim karakteristikama korištenog polimera i otapala te o naponu. Povećanje protoka uzrokuje povećanje dijametra (Okutan i sur., 2014), dok preveliki protok (uz postizanje kritičnog napona) utječe na nepotpuno formiranje polimernog mlaza, generiranje defektnih nanovlakana sa zaostalom vlagom (Keirouz i sur., 2023). S druge strane, prenizak protok može uzrokovati nepotpuno formiranje Taylorovog konusa i prijevremeno začepljenje igle/mlaznice (Teo i Ramakrishna, 2006).

Povećanje radne udaljenosti uglavnom će rezultirati nanovlaknima manjeg dijametra i pogodovat će učinkovitijem isparavanju manje hlapivog otapala te formiranju suhih nanovlakana (Ramakrishna i sur., 2005). Ipak, prevelika udaljenost može utjecati na prenamlašenu destabilizaciju mlaza, tako potencijalno utječući na neželjeno umrežavanje nanovlakana (Keirouz i sur., 2023).

Geometrija kolektora može značajno poboljšati optimizaciju željene morfologije nanovlakana obzirom na raspored i orijentaciju (linearno postavljena s nasumičnom orijentacijom, paralelno postavljena s uređenom strukturom/ponavljajućim uzorkom, pravilno umrežena nanovlakna i dr.) (Teo i Ramakrishna, 2006).

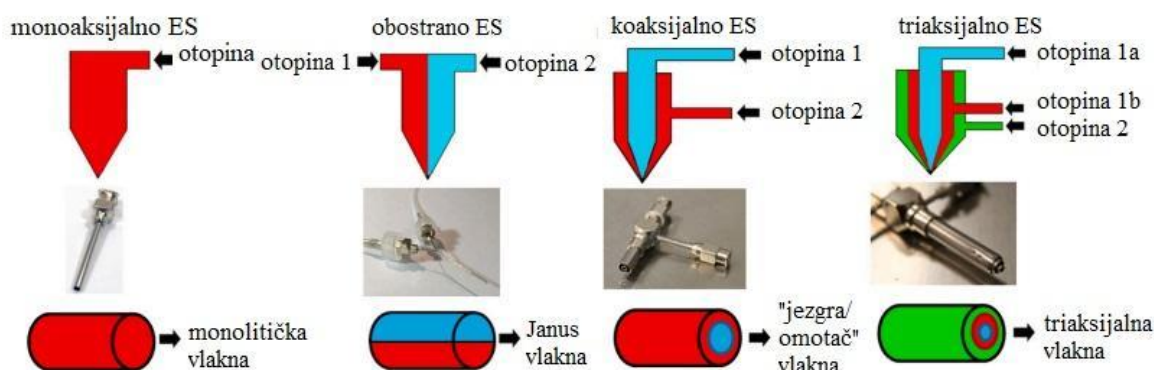
3) ambijentalni parametri

Temperaturu i relativnu vlažnost prostora u kojem se provodi elektroispredanje također treba uzeti u obzir za osiguranje kontinuiranosti procesa i uniformnost nanovlakana, osobito kod vodenih polimernih sustava. Iako postoji nedostatak sistematičnih istraživanja utjecaja ovih parametara, prekomjerno povišenje relativne vlažnosti može umanjiti, odnosno raspršiti elektrostatski naboj, ometajući tako pravovaljano generiranje mlaza. Smanjeno isparavanje vode, kao rezultat prethodnog zasićenja prostora vlagom, može potencijalno rezultirati nanomaterijalima povećane vlažnosti, slijepljivanjem nanovlakana i defektima poput vretenaste strukture (prisutnost globularnih nakupina u strukturi nanovlakana) (Lim i sur., 2019). Utjecaj ambijentalnih parametara u komercijalnim uređajima izbjegnuto je uvođenjem sustava za regulaciju vlage i temperature.

Izvedbe procesa

U proizvodnji nanovlakana koriste se dva osnovna pristupa izvedbi: kapilarno elektroispredanje i elektroispredanje metodom slobodnih površina (bez kapilare/igle/mlaznice). *Kapilarno elektroispredanje* (eng. *needle electrospinning*) provodi se pri naponima 5-20 kV u vodoravnoj ili vertikalnoj postavi, a što ovisi o međusobnim pozicijama pumpe i kolektora (Williams i sur., 2018a). Vodoravna postava podrazumijeva polegnutu poziciju i pumpe i kolektora, dok vertikalna postava uključuje polegnutu poziciju pumpe i okomit položaj kolektora obzirom na pumpu kao na Slici 8. Ovisno o željenom obliku i daljnjoj aplikaciji proizvedenih nanoobloga, za obje postave može se odabrati između pločastog ili rotirajućeg kolektora u različitim varijacijama (Abd Razak i sur., 2015). Za povećanje produktivnosti razvijeni su sustavi s višestrukim iglama (Theron i sur., 2005).

Ovisno o željenoj morfologiji nanovlakana, tj. rasprostranjenosti aktivne komponente u odnosu na nosač, ove dvije izvedbe primjenjuju se za: elektroispredanje binarnih polimernih otopina (eng. *blending electrospinning*), elektroispredanje emulzija (eng. *emulsion electrospinning*), koaksijalno elektroispredanje (eng. *co-axial electrospinning*) za proizvodnju inkapsuliranog sustava „jezgra-omotač“ (eng. „*core-shell*“), triaksijalno elektroispredanje (eng. *triaxial electrospinning*) za složeniju strukturu „jezgra-omotač“, elektroispredanje suspenzija (eng. *suspension electrospinning*), elektroispredanje centrifugiranjem (eng. *centrifugal electrospinning*) i druge varijacije (Slika 10). Monoaskijalnim elektroispredanjem binarne polimerne otopine, emulzije ili suspenzije proizvode se monolitička vlakna, dok korištenje dvije ili više polimernih otopina rezultira kompleksnijim strukturama građenima od jezgre ili više jezgri te omotača (Luraghi i sur., 2021).



Slika 10. Prikaz različitih morfoloških oblika nanovlakana obzirom na korišten broj i tipove polimernih otopina u izvedbi kapilarnog elektroispredanja (Luraghi i sur., 2021).

Obzirom da proizvodnju nanovlakana uz korištenje igle karakterizira niska produktivnost (protok od maksimalno par mililitara po satu) i česta začepljenja vrha igle uslijed isparavanja otapala, istraživanja su se sredinom 2000-tih godina usmjerila na razvoj novih metodologija koje će omogućiti učinkovitiju proizvodnju i prijelaz proizvodnje s laboratorijske na industrijsku razinu (Abdul Hameed i sur., 2023).

Elektroispredanje metodom slobodnih površina (eng. *needle-less/free surface electrospinning*) uključuje proizvodnju nanovlakana iz površinskog sloja električki ionizirane polimerne otopine (30-50 kV) pod utjecajem magnetno-električnog polja (Yarin i Zussman 2004; Lim i sur., 2019). Umjesto igle, koriste se različite konfiguracije elektroda poput metalnih diskova, cilindara, bubnjeva ili spiralnih rotirajućih zavojnica na koje se konstantnom brzinom nanosi sloj polimerne otopine (Subrahmanya i sur., 2021; Badmus i sur., 2021). Jedno od novijih rješenja uključuje aplikaciju polimerne otopine putem transportirajućih kolica na pozitivno nabijenu stacionarnu žičanu elektrodu. Konstantno električno polje osigurava se žicom uzemljene elektrode postavljene iznad žičane elektrode. Iz tankog sloja ravnomjerno raspoređene i električki nabijene otopine, formiraju se mnogobrojni mlazovi usmjereni prema kolektoru postavljenom između elektroda, odnosno uniformne obloge nanovlakana. Ovu izvedbu za komercijalnu proizvodnju patentirala je tvrtka El Marco u obliku NanoSpider™ tehnologije (Jirsak i sur., 2005; Lim i sur., 2019).

U Tablici 12 navedeni su najpoznatiji proizvođači uređaja za razvoj, ali i komercijalnu proizvodnju nanomaterijala u obliku nanovlakana s najvećom primjenom u kemijskoj, farmaceutskoj i biotehnoškoj industriji, biomedicini i industriji senzora.

Tablica 12. Svjetski proizvođači komercijalnih uređaja za elektroispredanje

| Proizvođač | Država podrijetla | Izvedba uređaja |
|------------------------|-------------------|--|
| Elmarco | Češka Republika | EMSP; rotirajući cilindar |
| Linari Nanotech | Italija | Multi EK |
| SKE Research Equipment | Italija | Multi EK, EMSP |
| Bioinicia Group | Španjolska | Multi EK, EMSP (Slit injektor), hibridni sustavi |
| Inovenso Inc. | SAD | Multi EK, EMSP |
| MECC Nanofiber | Japan | Multi EK |
| Kato Tech Co., Ltd. | Japan | Multi EK (do 400 igli) |
| Finetex Technology | Južna Koreja | EK pomoću blokova mlaznica |

EMSP-elektroispredanje metodom slobodnih površina; EK-kapilarno elektroispredanje

2.3.1.4. Nosači za inkapsulaciju

Odabir prikladnog nosača predstavlja ključan korak prilikom formuliranja inkapsuliranog sustava, a ovisi o: i) inkapsulacijskoj tehnici, ii) željenim fizikalno-kemijskim i mehaničkim karakteristikama inkapsuliranog sustava, iii) postojanju moguće interakcije s aktivnim komponentama tijekom procesiranja i skladištenja te iv) cijeni. Poželjne karakteristike nosača uključuju: *food grade* status, biodegradabilnost, biokompatibilnost, kemijsku inertnost, stabilnost u vodenom mediju, reološku fleksibilnost, neutralnost u boji, okusu i mirisu, primjerenu topljivost, nisku higroskopnost i ekonomičnost. (Wandrey i sur., 2010).

Nosači za inkapsulaciju mogu biti prirodnog i sintetskog podrijetla. U prehrambenoj industriji koriste se uglavnom nosači prirodnog podrijetla, odnosno hidrokoloide (biopolimeri) te lipidne komponente, dok su sintetski polimeri svoju primjenu pronašli u razvoju ambalažnih materijala s inkapsuliranim antimikrobnim agensima. U tu svrhu, najčešće se koriste polietileni i njihovi derivati, polieteri (polietilenglikol, polietilenoksid) te biodegradabilni poliesteri α -hidroksikiselina (polilaktična kiselina, poliglikolna kiselina) te laktone (polikaprolakton).

Obzirom na kemijsku strukturu, nosači prirodnog podrijetla dijele se na:

1) *Polisaharide*

- a) polisaharidi iz ekstrakata morskih algi: alginat, agar, karagenan
- b) polisaharidi staničnih stijenki viših biljaka: pektin, celuloza
- c) biljni egzudati: arapska guma, tragakant guma, guma karaya, ghatti guma
- d) polisaharidi iz endosperma sjemenki: guar guma, lokust (rogač) guma, škrob
- e) polisaharidi iz gomolja biljke: konjac guma, krumpirov škrob
- d) polisaharidi egzoskeleta rakova: hitin
- e) polisaharidi mikrobnog podrijetla: gelan guma, ksantan guma, pululan, dekstran

2) *Proteine*

- a) biljnoga podrijetla: sojini proteini, proteini graška, zein
- b) životinjskog podrijetla: kolagen, proteini sirutke, kazein, proteini svile

3) *Lipide*

- a) fosfolipide
- b) glikolipide
- c) mono- i digliceride

Često se koriste i različiti derivati polisaharida, dobiveni kemijskim i/ili enzimskim transformacijama, odnosno hidrolizama:

Celulozni derivati: karboksimetil celuloza, metilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza itd.

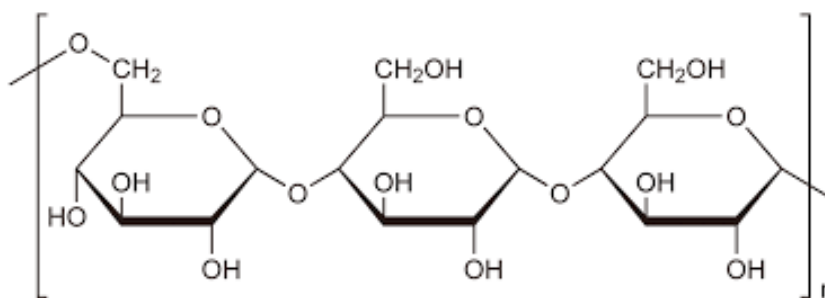
Škrobni derivati: modificirani škrob, acetilirani škrob, maltodekstrin, ciklodekstrin itd.

Derivat hitina: kitozan

Derivati pektina: amidirani, različiti tipovi obzirom na stupanj metilacije, acetilacije i sl.

Pululan je egzocelularni polisaharid dobiven biotehnološkom proizvodnjom pomoću kvascu slične plijesni *Aureobasidium pullulans*. Komercijalni supstrat za proizvodnju je hidrolizirani škrob, a brojna istraživanja usmjerena su na optimizaciju uvjeta fermentacije u cilju povećanja iskorištenja procesa. Kemijsku strukturu pululana čini α -D-glukan, odnosno jedinice maltotrioze linearno povezane s α -1,6 glikozidnim vezama, dok je glukoza unutar maltotrioze povezana α -1,4 glikozidnim vezama. Karakterizira ga hidrofilnost uslijed prisutnosti velikog broja hidroksilnih skupina, amorfna struktura i odsustvo gelirajućih svojstava (Kristo i Biliaderis, 2006; Singh i sur., 2021). Ovisno o željenom stupnju supstitucije hidroksilnih grupa i strukturnoj modifikaciji, često se primjenjuju reakcije esterifikacije, kopolimerizacije, eterifikacije, oksidacije, amidacije i sl. (Niu i sur., 2019). Generalno, esterifikacija modificira polarnost pa je tako acetiliranjem pululana uspješno formuliran nanoinkapsulirani dozirni sustav s kurkuminom, poboljšanih fizikalno-kemijskih karakteristika i gastrointestinalne stabilnosti (Ganeshkumar i sur., 2016). Česta je i esterifikacija kolesterolom i oktenil sukcinin anhidridom za povećanje amfifilnog karaktera, odnosno emulgirajućih svojstava (Singh i sur., 2017; Zhao i sur., 2020).

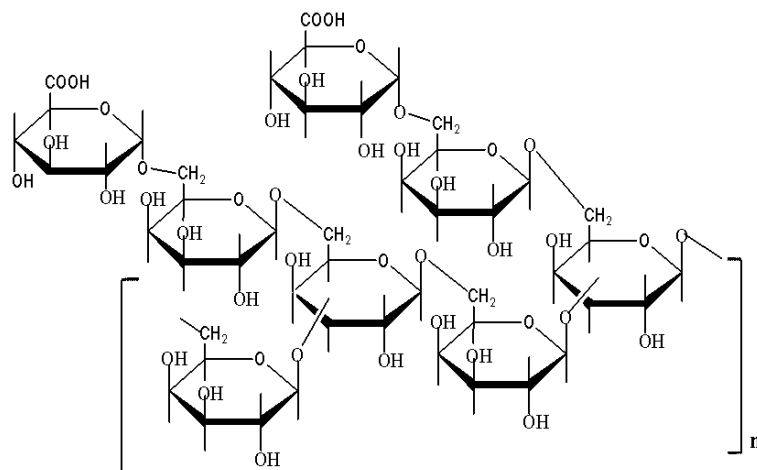
Neutralan senzorski profil, toplinska stabilnost, biokompatibilnost, dobra mehanička i fizikalno-kemijska svojstva čine ga prikladnim za različite primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji (Trovatti i sur., 2012; Wypij i sur., 2023; Liu i sur., 2024; Singh i sur., 2021). Osobito se istražuje za primjenu u proizvodnji pametne ambalaže u formi filmova i nanoinkapsuliranih oblika zbog nepropusnosti kisika, mogućnosti tvorbe transparentnih filmova otpornih na lipofilne komponente i održavanja svježine proizvoda (Chen i Chi, 2021; Zhang i sur., 2023; Li i sur., 2022). Uspješnu primjenu pronalazi i u prehrambenim proizvodima kao zamjena za škrob u niskokaloričnim proizvodima, stabilizator, zgušnjivač i tvar za zadržavanje vlage (Qayum i sur., 2024; Kycia i sur., 2020; Shao i sur., 2023). Otporan je na djelovanje α -amilaze te posjeduje prebiotički potencijal (NithyaBalaSundari i sur., 2020).



Slika 11. Kemijska struktura pululana.

Arapska guma je biljni egzudat iz debla i grana stabala iz roda *Acacia*, među kojima su komercijalno najznačajnije *A. senegal* i *A. seyal* (Abuarra i sur., 2014). Polisaharide arapske gume čine dominantno čine razgranati, blago kiseli i li neutralni arabinogalaktani u kojima okosnicu čine D-galaktozil jedinice povezane β -1,3-glikozidnom vezom, s bočno 1,6-vezanom galaktozom, ali i arabinozom, ramnozom, glukozom, glukuronskom kiselinom i/ili 4-*O*-metil- β -D-glukozom s prisutnošću njihovih soli, ovisno o podrijetlu, vrsti, uvjetima uzgoja i sl. (Siddig i sur., 2005; Lopez-Torrez i sur., 2015). U suštini, arapsku gumu čini kompleks dominantnog arabinogalaktana (88 %), proteina arabinogalaktana (10 %) i glikoproteina (< 2 %) (Desplanques i sur., 2012).

Arapska guma je široko istražen polisaharid u različitim područjima primjene; prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj, kozmetičkoj, papirnoj industriji i dr. U prehrambenoj industriji koristi se kao stabilizator, emulgator, flokulant i zgušnjivač u konditorskim, pekarskim, mliječnim proizvodima i napitcima, zahvaljujući amfifilnom karakteru (prisutnost amino i karbonilnih skupina u proteinima te karboksilnih skupina u glukuronskoj kiselini) te reološkim svojstvima koji omogućuju kontrolu i modifikaciju viskoznosti. Pri udjelu do 30 % arapska guma se ponaša kao Newtonovski fluid, dok pri većim koncentracijama pokazuje pseudoplastično ponašanje (Barak i sur., 2020). Istražuje se i njezin potencijal u proizvodnji antimikrobnih jestivih filmova (Karaaslan i sur., 2021). Komercijalno se koristi i kao nosač za inkapsulaciju biljnih ekstrakata (Gali i sur., 2022), polifenolnih spojeva (Luan i sur., 2023), aroma (Li i sur., 2022), uljnih komponenti (Bordón i sur., 2023), stabilizaciju voćnih pripravaka (Estupiñan-Amaya i sur., 2022) i sl., primjenom različitih inkapsulacijskih tehnika.

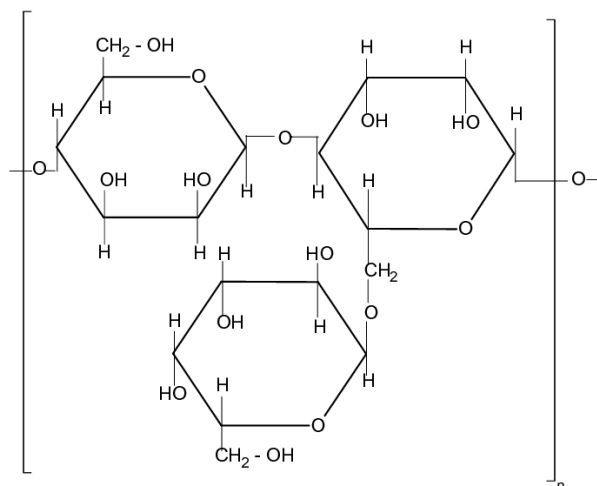


Slika 12. Kemijska struktura arapske gume.

Guar guma je galaktomananski polisaharid dobiven iz ekstrahiranog i usitnjenog endosperma sjemena mahunarke *Cyamopsis tetragonoloba* L. Visoko razgranata struktura rezultat je vezanih jedinica α-D-galaktoze 1,6-glikozidnom vezom na glavni lanac građen od β-D-manoze, u približnom 2:1 omjeru manoze i galaktoze (Roberts, 2011). Zbog visokog afiniteta prema stvaranju vodikovih veza, guar guma ima veliku sposobnost vezanja vode, čak 8 puta veću u odnosu na druge komercijalne polisaharide poput arapske gume i kukuruznog škroba, pri čemu su potrebne vrlo male koncentracije za postizanje vrlo viskoznih otopina (Yousif i sur., 2017). Ima široku komercijalnu primjenu s težištem na prehranu industriju kao stabilizator, zgušnjivač i zamjena za lipide u proizvodnji umaka i preljeva, mliječnih, mesnih, pekarskih, proizvoda smanjene kalorijske vrijednosti i napitaka. Istražen je i sinergistički učinak guar gume u kombinaciji s ksantan gumom na sustavima gelova (Karaman i sur., 2014), integralnom kruhu obogaćenom β –glukanima (Ahmed i Thomas, 2018), marshmallow proizvodu (Mardani i sur., 2019), kao zamjeni za jaja u kombinaciji sa chubak saponinskim ekstraktom (Hedayati i sur., 2021), a koji se očituje u modifikaciji viskoelastičnih karakteristika, poboljšanju teksture i povećanja kapaciteta vezanja vode i kapaciteta pjenjenja. Primjenjuju se i kemijske modifikacije guar gume za specifične namjene poput karboksimetilacije, sulfatacije, depolimerizacije i sl., a za učinkovitiju optimizaciju viskoznosti enzimski se proizvodi djelomično hidrolizirana guar guma enzimskim procesom (Gupta i Verma, 2014; Behera i sur., 2022).

Brojna istraživanja dokazala su prikladnost guar gume u stabilizaciji biljnih ekstrakata (Šeremet i sur., 2024), smrznutih deserata (Bachate i sur., 2021), aroma (Duhan i sur., 2021), karotenoida (Yang i sur., 2022), ulja bogata omega-3-masnim kiselinama (Ogrodowska i sur.,

2020) i sl. Kao i u slučaju prethodno spomenutih polisaharida, guar guma također se koristi u razvoju formulacija nanokompozitnih filmova, aktivnih prevlaka za pakiranje i sl. (Khan i sur., 2022; Bhat i sur., 2023).

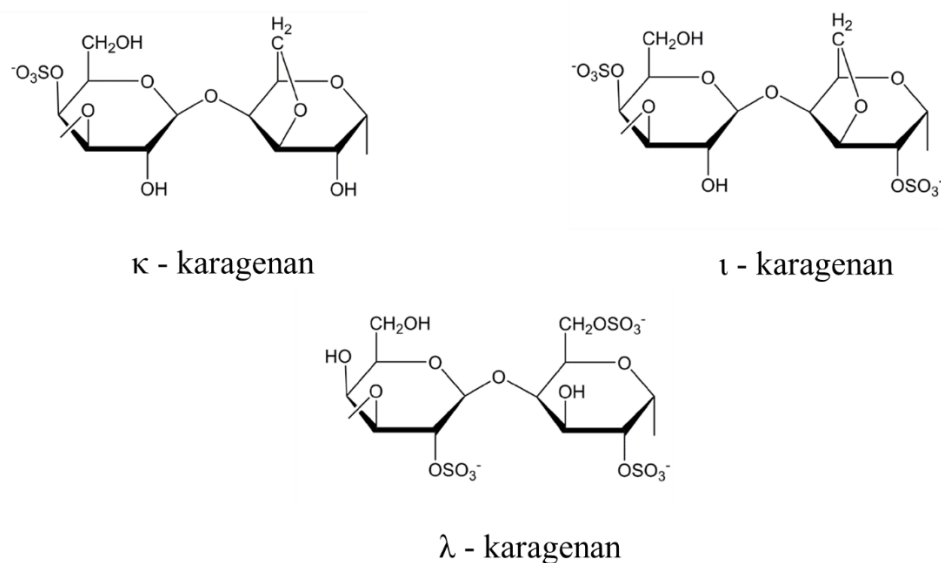


Slika 13. Kemijska struktura guar gume.

Karagenan je linearni polisaharid dobiven alkalnom ekstrakcijom iz crvenih algi, a osnovnu strukturu čini ponavljajući disaharid građen od α -D-galaktoze i 3,6-anhidrogalaktoze preko 1,3-, odnosno 1,4-glikozidne veze (Machado i sur., 2019). Ovisno o broju i poziciji sulfatne grupe, najčešći tipovi karagenana su: kapa (κ -), jota (ι -), lambda (λ -), mu (μ -), nu (ν -) i theta (Θ) (Li i sur., 2014). Komercijalno najvažniji, κ - (jedna sulfatna grupa), ι - (dvije sulfatne grupe) i λ - (tri sulfatne grupe), značajno se razlikuju po fizikalno-kemijskim svojstvima, odnosno hidrofilnosti, sposobnosti želiranja, elektronegativnosti i sinergističnom učinku s drugim hidrokolidima (Alba i Kontogiorgos, 2018). Povećanjem broja sulfatnih grupa, topljivost i sposobnost tvorbe gela opada (Li i sur., 2014).

U prehrambenoj industriji, karagenan se konvencionalno koristi kao sredstvo za želiranje u bombonskim proizvodima i kao zgušnjivač u mliječnim proizvodima, obzirom na značajne interakcije s mliječnim proteinima. Istražuje se i potencijalna uloga u produljenju kvalitete pekarskih proizvoda tijekom skladištenja (Huang i sur., 2021) i zamjenama za meso (Cao i sur., 2022). Zbog mogućnosti tvorbe stabilnih gelova, umrežavanja, kao i učinkovite interakcije s hidrofobnim i hidrofilnim komponentama, karagenan pronalazi primjenu i kao biopolimerni nosač za zaštitu bioaktivnih sastojaka te njihovo kontrolirano otpuštanje. Tako su uspješno formulirane nanočestice i hidrogelovi za zaštitu i učinkovitiju isporuku kurkumina i piperina (Chen i sur., 2020), imunoglobulina iz bjelanjka jajeta u formi hidrogel čestica (Gu i

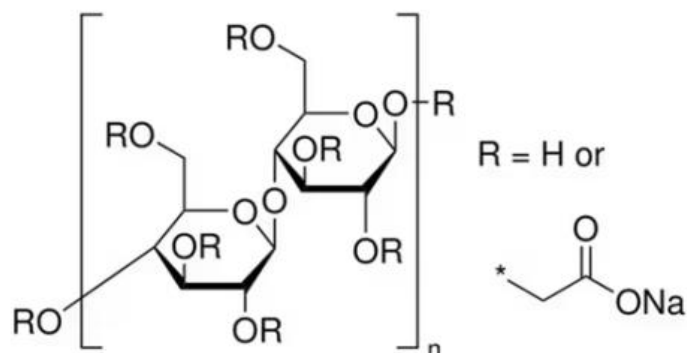
sur., 2021), *Bidifobacterium longum* u formi koacervata (Mao i sur., 2019), ekstrakata *Camellie sinensis* u formi mikročestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (Baltrusch i sur., 2022) i dr.



Slika 14. Kemijska struktura komercijalno najvažnijih tipova karagenana.

Karboksimetil celuloza (KMC) je vodotopivi, anionski derivat celuloze proizveden eterifikacijskom susptitucijom hidroksilne skupine s karboksimetilnom grupom na glukoznoj jedinici unutar polimernog lanca (Imran i sur., 2014). KMC ima različita fizikalno-kemijska i reološka svojstva ovisno o stupnju polimerizacije, stupnju supstitucije hidroksilnih grupa i čistoći potrebnoj za industrijsku, farmaceutsku i prehrambenu uporabu. Za razliku od drugih celuloznih derivata poput hidroksipropilmetil celuloze i metilceluloze, KMC nema sposobnost emulgiranja (Arancibia i sur., 2013)

Ovisno o viskoznosti, KMC se može koristiti kao modifikator teksture u mliječnim proizvodima, sladoledu, preljevima i dr., kao sredstvo za želiranje ili kao sredstvo za prevenciju sedimentacije u napitcima. Osim potvrđene uloge stabilizatora, poboljšivača teksture i sredstva za vezanje vlage, KMC se intenzivno koristi za razvoj biokompatibilnih regenerativnih materijala u biomedicini (Priya i sur., 2021), biodegradabilnih dozirnih sustava u obliku mikročestica, primjerice za probiotičke bakterije (Zhang i sur., 2023), kurkumin (Zhu i sur., 2021), biljne ekstrakte (Castro-López i sur., 2021) i sl., a najveći fokus usmjeren je na istraživanja vezana za primjenu u aktivnoj ambalaži s inkorporiranim bioaktivnim spojevima (Parvaneh i sur., 2023), bakterijama mliječne kiseline (Li i sur., 2020) i biljnim ekstraktima antimikrobnog djelovanja (Sganzerla i sur., 2021)



Slika 15. Kemijska struktura karboksimetil celuloze.

Kolagen je jedan od najistraživanijih biopolimera obzirom na biološki značaj u sastavu kože, tetiva, hrskavica i stijenci krvnih žila, kao i kvantitativan udjel na ukupne gradivne proteine u organizmu (od 33 %). Temeljnu strukturu čini trostruka polipeptidna uzvojnica/tropokolagen s Gly-Y-Z aminokiselinskom sekvencom, kao strukturno najučestalijom (glicin predstavlja svaku treću aminokiselinu, Y je najčešće prolin, a Z hidroksiprolin) (Fratzl, 2008). Do danas je okarakterizirano 29 tipova kolagena, a razlike se očituju u: i) prisutnosti polarnih aminokiselina (Arg, Lys, Glu, Asn), oblicima globularnih domena, duljini aminokiselinskog lanca i aminokiselinskim intervalima (Myllyharju i Kivirikko, 2004). Toplinskom denaturacijom kolagena (> 250 kDa) nastaje želatina (15-250 kDa), a primjenom kemijske hidrolize, enzimskih tretmana i/ili proteolitičkom fermentacijom kolagena ili želatine nastaju peptidi (300-8000 Da) (Bello i sur., 2020; León-López i sur., 2019). Kolagen i želatina ima dugu i opsežnu komercijalnu primjenu u većini kategorija prehrambenih proizvoda i farmaceutskoj industriji zahvaljujući hidrokoloidnom karakteru koji pruža stabilizirajuća svojstva tvoreći gelove, emulzije i pjene poželjne konzistencije, uz modifikaciju boje i okusa finalnog proizvoda (Santana i sur., 2011; Mardani i sur., 2019). Hidrolizirani kolagen i peptidi kao derivati želatine poboljšane topljivosti i niske viskoznosti pronašli su komercijalnu primjenu u funkcionalnim napitcima, sportskim suplementima i nutraceuticima obzirom na poželjan zdravstveni učinak (Sato, 2017; Oertzen-Hagemann i sur., 2019). U kontekstu inkapsulacije, kolagen se koristi kao biopolimerni nosač u razvoju pametnih ambalažnih materijala obogaćenih biljnim ekstraktima ili bioaktivnim spojevima antimikrobnih svojstava (Rodrigues i sur., 2020; Ren i sur., 2023), dok je u biomedicini dugo istraživan u proizvodnji regenerativnih materijala, funkcionalnih filmova, hidrogelova i nanovlakana u cilju poboljšanja adhezije stanica i proliferacije (Shah i sur., 2019; Carolo i sur., 2023). Tehnološka

ograničenja kolagena i njegovih derivata odnose se na relativno slaba mehanička svojstva, visoku higroskopnost i tendenciju bubrenja, te se stoga pristupa različitim kemijskim, enzimskim i fizikalnim postupcima umrežavanja polipetidnih lanaca (Huang i sur., 2019; Shah i sur., 2019; Lukatsky i sur., 2024).

Proteini konoplje su važna komponenta pogače konoplje kao nusprodukta proizvodnje ulja iz sjemenki konoplje (*Cannabis sativa* L.). Sjemenke konoplje sadrže komercijalno značajan udjel proteina (25 %), uz relativno nisku koncentraciju antinutritivnih komponenata, tj. fitinske kiseline, kondenziranih tanina i tripsin inhibitora (Leonard i sur., 2020). Značajan rast publikacija na temu valorizacije proteina iz konoplje u posljednjih pet godina (u razdoblju 2019-2024 objavljeno je čak 641 od ukupno 950 znanstvenih radova u WoS-u prema ključnim riječima „hemp protein“) izravno je povezan s nutritivnim profilom, odnosno optimalnim omjerom aminokiselina i prisutnošću svih esencijalnih aminokiselina, kao i tehnološkim karakteristikama koje omogućuju njihovu široku primjenu kao emulgatora, sredstava za pjenjenje, stabilizatora, hidrokoloida i biopolimera za proizvodnju ambalažnih filmova. Ovisno o stupnju pročišćavanja i hidrolize te željenim funkcionalnim svojstvima, iz pogače odnosno brašna konoplje, kao izvornog nusprodukta, moguće je pripremiti koncentrat (minimalno 65 % proteina), izolat (> 90 %) i hidrolizat proteina konoplje (2-20 aminokiselina u sekvenci) (Wang i sur., 2008).

Strukturne proteine čine globulin edestin (60-80 %) i albumin (20-40 %). Edestin karakterizira veći udjel cisteina i metionina, hidrofobnih aminokiselina te veći omjer Arg/Lys (4,37), usporedno s albuminskom frakcijom (Arg/Lys=1,74) (House i sur., 2010; Tang i sur., 2006). Obzirom da je arginin prekursor nitratnog oksida kao vazodilacijskog agenta (Wu i Meininger, 2002), izolati konoplje pored nutritivnog pokazuju i značajan bioaktivni potencijal za formulacije funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Zbog fleksibilnije strukture i manjeg udjela tiolnih skupina povezanih disulfidnim mostovima, albuminska frakcija ima bolju topljivost i veći kapacitet pjenjenja u odnosu na globulinsku, dok je emulgacijski potencijal sličan za obje frakcije (Malomo i Aluko, 2015). Proteinski izolat konoplje najčešće se proizvodi alkalnom ekstrakcijom uz izoelektričnu precipitaciju (pH=9-10), a intenzivno se istražuju i različite fizikalne, kemijske i enzimске modifikacije u cilju povećanja funkcionalnosti (Orio i sur., 2017; Wang i Xiong, 2019). Toplinski tretmani, hidrolize komercijalnim proteazama poput pepsina, alkalaze, protameksa i neutraze, te derivatizacije acilacijom i sukcinilacijom, značajno mogu modificirati topljivost i kapacitet zadržavanja vode, sposobnost emulgiranja i hidrofobni potencijal izolata i hidrolizata (Wang i sur., 2018; Samaei i sur., 2021; Yin i sur., 2009).

Komercijalna primjena proteinskih derivata konoplje relativno je neistražena, a dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na razvoj ambalažnih materijala (Lamsaf i sur., 2023) i funkcionalne hrane (Hidas i sur., 2023) obzirom na antioksidacijska i hipoglikemijska svojstva, te visoku probavljivost i sl. (Saad i Dia, 2023; Cai i sur., 2023; Russo i Reggiani, 2015). U kontekstu inkapsulacije, derivati proteina konoplje također su slabo istraženi, a dostupni radovi usmjereni su na inkapsulaciju ulja tehnikom koacervacije (Plati i Paraskevopoulou, 2023; Liu i sur., 2023).

Zein predstavlja proteinsku frakciju izoliranu iz kukuruzne sačme kao nusprodukta prerade kukuruza bogatog proteinima endosperma (60-71 %). Prema klasifikaciji proteina, zein je prolamin i dominira udjelom svih prisutnih tipova proteina u endospermu s udjelom 44-79 % (Anderson i Lamsal, 2011; Pascoli i sur., 2018). Frakcije zeina kategoriziraju se prema molekularnoj masi i strukturi na: α -, β -, γ - i δ - zein, s α - zeinom kao najzastupljenijom frakcijom u komercijalno dostupnom zeinu (Pascoli i sur., 2018). Karakterizira ga visok udjel hidrofobnih aminokiselina (55 %) te manjak esencijalnih aminokiselina, osobito lizina i triptofana (Wang i Padua, 2012). Otapa se u (visokopostotnim) alkoholnim otopinama, organskim kiselinama (ledenoj octenoj i mravljoj kiselini), urei i visokolužnatim otopinama (pH > 11) (Shukla i Cheryan, 2001), a ta izražena hidrofobnost, kao i relativno niska nutritivna iskoristivost u organizmu, glavni su limitirajući faktori primjene zeina u prehrambenoj industriji. Primjena enzimske i kemijske deamidacije te enzimske hidrolize zeina ima bolji potencijal u odnosu na kemijsko umrežavanje ili upotrebu oksidacijskih agensa za povećanje topljivosti u vodenom mediju, sposobnosti emulgiranja, biodostupnosti i bioraspoloživosti, sposobnosti pjenjenja i dr., u netoksičnom okruženju (Foegeding i Davis, 2011; Glusac i Fishman, 2021).

Dosadašnja istraživanja na temu valorizacije zeina upućuju na izražen potencijal primjene zeina kao supstrata za formuliranje nanokompozitnih filmova (Gunes i sur., 2020), aktivnih ambalažnih filmova (Cui i sur., 2020), te za inkapsulaciju bioaktivnih sastojaka elektroispredanjem (Bumedi i sur., 2023), samoagregacijom (Yuan i sur., 2021), kompleksacijom (Chen i sur., 2020) i dr. Isplativost proizvodnje i odsustvo glutena u sastavu čine zein vrlo atraktivnim proteinom u istraživanjima vezanim za pekarske proizvode i zamjene za meso (Federici i sur., 2021; Salgado i sur., 2023).

Prema dostupnoj literaturi, sistematizirani su neki primjeri valorizacije ekstrakata različitih nadzemnih dijelova biljnih vrsta i voća prema korištenom (bio)polimernom sustavu nosača i ekstrakcijskoj tehnici u cilju stabilizacije polifenolnih spojeva u proteklih pet godina (Tablica 13).

Tablica 13. Primjeri primjene različitih tehnika za inkapsulaciju polifenolnih ekstrakata objavljeni tijekom posljednjih pet godina

| Tehnika inkapsulacije | Sustav nosača | Polifenolni ekstrakt | Cilj/primjena | Referenca |
|---|---|--|---|-----------------------------|
| sušenje raspršivanjem | arapska guma, kitozan, alginat | 96 %-tni etanolni ekstrakt nadzemnog dijela bazge (<i>Sambucus nigra</i>) | produljenje stabilnosti tijekom skladištenja i praćenje kinetike otpuštanja | Ribeiro i sur. (2019) |
| inkapsulacija hlađenjem | stearinska masna kiselina uz poliglicerol poliricinoleat | 80%-tni metanolni ekstrakt endokarpa ploda <i>Genipa Americana</i> | ispitivanje modulacije biološke aktivnosti iridoida | Neri-Numa i sur. (2020) |
| inkapsulacija u fluidizirajućem sloju | hidroksipropilmetil celuloza, polivinil acetat | 70 %-tni etanolni ekstrakt kore manga | praćenje stabilnosti i antioksidacijske aktivnosti | Sriwidodo i sur. (2022) |
| ionsko geliranje | niskometilirani pektin i amilopektinski škrob+CaCl ₂ | 70 %-tni etanolni ekstrakt nara (<i>Punica granatum</i>) | očuvanje boje ekstrakta, kontrolirano otpuštanje | Silveira i sur. (2023) |
| ionsko geliranje | kitozan+natrijev tripolifosfat | vodeni ekstrakt pulpe acerole (<i>Malpighia emarginata</i>) u 1 %-tnoj octenoj kiselini i kitozanu (w/v) | formiranje aktivne ambalaže obogaćene antocijanima i vitaminom C za produljenje roka trajanja guave | da Silva i sur. (2021) |
| kompleksna koacervacija | arapska guma, maltodekstrin | 70 %-tni etanolni ekstrakt crne mrkve (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> var. <i>Atrorubens Alef</i>) | praćenje stabilnosti i bioraspoloživosti koacervata na modelu čokoladnog i obranog mlijeka te jabučnog soka | Ayar i sur. (2024) |
| kompleksna koacervacija | želatina, tragakant guma | 70 %-tni etanolni ekstrakt lista masline (<i>Olea europaea</i>), uz dodatak 1 %-tne octene kiseline | usporavanje reakcije lipidne peroksidacije u hamburgeru tijekom skladištenja | Oliveira i sur. (2022) |
| liposomalna inkapsulacija | sojin lecitin, stigmasterol | 62 %-tni etanolni ekstrakt lista centele (<i>Centella asiatica</i>) | praćenje stabilnosti i antioksidacijske aktivnosti tijekom skladištenja | Tripathy i Srivastav (2023) |
| liposomalna inkapsulacija | fosfolipon | vodeni ekstrakt nadzemnog dijela trave ive (<i>T. montanum</i>) | praćenje kinetike otpuštanja i stabilnosti ekstrakta u napitcima kave | Šeremet i sur. (2022) |
| nanoemulgiranje uz isparavanje otapala | kitozan+proteini soje uz Tween 20 | 96 %-tni etanolni ekstrakt komine jabuke | obogaćivanje i praćenje antioksidacijske aktivnosti soka ananasa i jabuke | Ahmed i sur. (2020) |
| elektrosprejanje | zein | 70 %-tni etanolni ekstrakt brokule (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) | praćenje stabilnosti u GI uvjetima i antihiperглиkemijske aktivnosti | Radünz i sur. (2021) |

GI-gastrointestinalni uvjeti

2.3.2. Funkcionalna hrana

2.3.2.1. Izazovi na tržištu

Povećanje svijesti o važnosti pravilne prehrane i jačanju imunološkog sustava te fokus na održivosti implementiranoj u mnogim segmentima svakodnevnog života, intenzivno utječu na transformaciju globalnog tržišta hrane. Pored nutritivnog sadržaja, zahtjevi potrošača usmjereni su i na dodanu vrijednost prehrambenog proizvoda, a koja se odnosi na bioaktivne sastojke koji dokazano imaju pozitivne učinke u prevenciji pojave kroničnih oboljenja. Tržište segmenta prehrambenih funkcionalnih proizvoda je u nezaustavljivom rastu koji je dodatno potaknut popularizacijom personalizirane prehrane te pojačanom suplementacijom potrošača (Anonymus, 2024c). Vrijednost globalnog tržišta funkcionalnih prehrambenih proizvoda u 2024. godini procijenjena je na 119,2 milijarde dolara, a do 2029. godine predviđa se porast vrijednosti do 165,8 milijarde dolara po prosječnoj godišnjoj stopi rasta od 6,8 %. U jačanju tržišta funkcionalne hrane, primjena inkapsulacijskih tehnologija se navodi kao ekonomski unosna prilika za poboljšanje kvalitete i proširenje asortimana prehrambenih proizvoda, dok se istovremeno kao glavni izazovi ističu tehnološka i regulatorna kompleksnost plasiranja takvih proizvoda na globalno tržište hrane, kao i povećan rizik od patvorenja takvih proizvoda (Anonymus, 2024a).

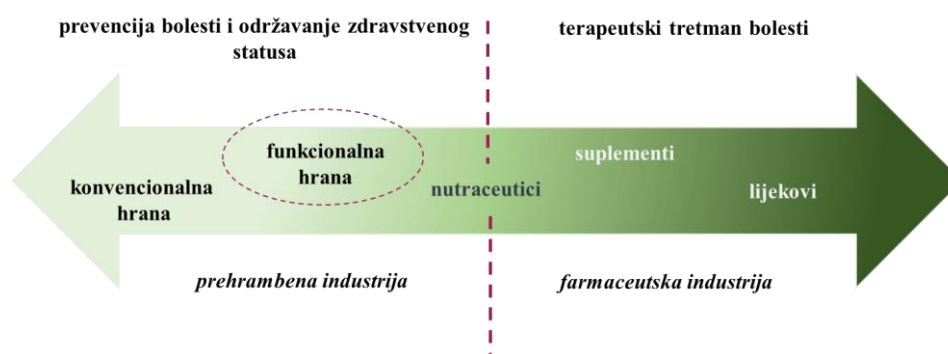
Funkcionalna hrana definira se kao hrana u svom prirodnom, nemodificiranom obliku, kao i svaka hrana odnosno proizvod kojemu je pojačan udjel, dodana ili uklonjena komponenta određenim tehnološkim i/ili biotehnološkim postupcima, a čijom se konzumacijom kao dijelom uravnotežene prehrane, pored nutritivnih potreba, omogućuju i povoljni učinci na jednu ili više funkcija u ljudskom organizmu, potičući tako poboljšanje općeg zdravlja (EC, 2006). Funkcionalni sastojci su: bioaktivne komponente (polifenolni spojevi, metilksantini, biljni pigmenti, topljiva i netopljiva vlakna), nezasićene masne kiseline, aminokiseline, polioli kao zamjene za saharozu, vitamini, mineralne tvari i dr. Jedna od mogućih podjela funkcionalnih proizvoda prikazana je u Tablici 14.

Tablica 14. Kategorije funkcionalne hrane (Spence, 2006)

| Kategorija | Definicija | Primjeri |
|--|--|--|
| nepreporučena hrana (eng. <i>whole food</i>) | hrana u izvornom obliku | voće, povrće, ulja bogata nezasićenim masnim kiselinama, začinsko bilje |
| obogaćeni proizvodi (eng. <i>enriched / fortified</i>) | proizvodi s dodatnim udjelom već postojećih (ne)nutritivnih komponenata ili proizvodi s dodatkom novih (ne)nutritivnih komponenata koji inače nisu prisutni u ishodišnom prehrambenom matriksu | mljeko obogaćeno vitaminom D, voćni sokovi obogaćeni vitaminom C margarin obogaćen fitosterolima, žitarice za doručak obogaćene vitaminom D |
| izmijenjeni proizvodi (eng. <i>altered</i>) | proizvodi u kojima je nutritivna komponenta i/ili prirodno prisutan antinutrijent zamijenjena nutrijentom povoljnog učinka | čokolada sa poliolima, proizvodi sa smanjenim udjelom masti poput majoneze, mliječnih proizvoda, žitarice za doručak sa smanjenim udjelom šećera |
| poboljšani proizvodi (eng. <i>enhanced commodities</i>) | proizvodi prirodno obogaćeni (ne)nutritivnim komponentama kroz specijalne pristupe uzgoju biljaka (genetske modifikacije sorti) i životinja (izmijenjena prehrana) | kukuruz s visokim udjelom lizina za bolju, riža s beta-karotenom, jaja s većim udjelom omega-3-masnih kiselina, rajčica s većim udjelom likopena |

Koncept funkcionalne hrane nastao je još 1984. godine u Japanu, a Ministarstvo zdravstva, rada i socijalne skrbi Japana (MHLW) ga je 1991. godine integriralo u japanski zakonodavni sistem kao „hranu za određenu namjenu“ („foods for specified health use“) ili tzv. FOSHU, zamjenjujući tako dotad vladajući termin „funkcionalne hrane“ (MHLW, 1991). Primarni razlog zamjene termina je zaštita potrošača, odnosno izbjegavanje krivog tumačenja u vidu potencijalne implikacije djelovanja takve hrane kao lijeka te mogućih terapijskih učinaka ili liječenja bolesti konzumacijom takve hrane (Ohama i sur., 2014; Vukasović, 2017). Međutim, sintagma „funkcionalna hrana“ se i dalje koristi u Europi i Americi i kao takva može imati zbunjujuću konotaciju među potrošačima. Jasna komunikacija razlike između lijeka/terapeutika (trenutni učinak na ljudsko zdravlje) i hrane (dugoročni efekt na zdravstveno stanje), te naglasak na „funkcionalnoj hrani“, kao jednoj od mogućih strategija poboljšanja zdravstvenog statusa i prevencije kroničnih oboljenja ukoliko se konzumira kao dio svakodnevne prehrane, od presudne je važnosti za održavanje transparentnog odnosa prehrambene industrije prema potrošačima. Obzirom na značajno proširenje asortimana funkcionalnih prehrambenih proizvoda, suplemenata i nutraceutika tijekom posljednjeg

desetljeća te ispreplitanje njihove ciljane namjene u ljudskoj prehrani, potrebno je osvijestiti realna očekivanja i moguće zdravstvene učinke pri konzumaciji takvih proizvoda (Slika 16).



Slika 16. Pozicije određenih kategorija proizvoda na prehrambenom i farmaceutskom tržištu (prema Domínguez Díaz i sur., 2019).

Za razliku od Japana, koji jedini dosad implementirao zakonodavni okvir za regulaciju funkcionalne hrane kao specifične kategorije hrane (Food with Health Claims system), u SAD-u i Europskoj Uniji funkcionalna hrana smatra se više konceptom unutar konvencionalne hrane i prema tome, podliježe svim zakonima konvencionalnih prehrambenih proizvoda. Prehrambenom tvrdnjom se naznačuje da hrana ima blagotvorna prehrambena svojstva zahvaljujući kalorijskoj vrijednosti i/ili hranjivim tvarima, dok zdravstvena tvrdnja sugerira odnos između neke kategorije hrane ili njenih sastavnica i zdravlja (Tablica 15). Uredbom (EU) 2015/2283 regulirana je funkcionalna hrana sa sastojcima tzv. nove hrane (EC, 2015).

Tablica 15. Neki primjeri prehrambenih tvrdnji autoriziranih od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA)

| Tvrdnja | Uvjeti korištenja prehrambene tvrdnje | Referenca |
|---|--|-----------|
| „smanjena energijska vrijednosti“ | energetska vrijednost je smanjena za barem 30 %, sa jasnom indikacijom reducirajuće komponente | EC (2006) |
| „nizak udjel zasićenih masnih kiselina“ | proizvod ne sadrži > 1,5 g masti na 100 g proizvoda ili 0,75 g na 100 mL, a maksimalan udjel zasićenih i trans-masnih kiselina na ukupnu energetska vrijednost ne smije biti > 10% | EC (2006) |
| „nizak udjel šećera“ | proizvod ne sadrži > 5 g šećera na 100 g proizvoda ili > 2,5 g na 100 mL | EC (2006) |
| „bez šećera“ | proizvod ne sadrži > 0,5 g šećera na 100 g proizvoda ili 100 mL | EC (2006) |
| „izvor vlakana“ | proizvod sadrži minimalno 6 g vlakana na 100 g proizvoda ili bar 3 g vlakana na 100 kcal | EC (2006) |
| „bez dodane soli“ | proizvod ne sadrži > 0,12 g natrija/soli ili nekog drugog proizvoda koji sadrži natrij/sol ili ekvivalente vrijednosti za sol na 100 g proizvoda ili 100 mL | EC (2012) |

Proces odobrenja novih zdravstvenih tvrdnji vrlo je kompleksan i zahtjeva iscrpnu znanstvenu dokumentaciju koju evaluira Europska agencija za hranu (EFSA), a uključuje: a) potpunu karakterizaciju hrane/komponente s pripadajućim specifikacijama, definiranu biološku aktivnost, standardizaciju tehnološke proizvodnje, definiranu količinu i način konzumacije za postizanje zdravstvenog učinka, b) provedene animalne i kliničke studije koja nedvojbeno potvrđuju uzročno-posljedičnu vezu između testirane hrane/komponente i utjecaja na zdravstveni status (EFSA, 2016).

2.3.2.2. Funkcionalni bombonski proizvodi

Povećana briga o zdravlju, fokus potrošača na prevenciju kroničnih oboljenja te popularizacija hrane bazirane na biljnim izvorima, značajno su pridonijele transformaciji tržišta konditorskih proizvoda. Segment bombonskih proizvoda oduvijek je jedan od najatraktivnijih na globalnom tržištu hrane, a novi smjerovi u prehrambenoj industriji temeljeni su na: i) integraciji generacije Z u dominantnu potrošačku populaciju pored aktivnih Milenijalaca, ii) tehnološkim inovacijama, iii) povećanoj konzumaciji “snack” ili “ready-to-eat” proizvoda, iv) biljnoj prehrani i v) popularizaciji egzotičnih okusa i inovativnih koncepata hrane. Shodno navedenome, pred industrijom bombonskih proizvoda stavlja se zahtjevan zadatak koji obuhvaća: i) modifikaciju tehnoloških procesa baziranih na sastojcima biljnog podrijetla, ii) supstituciju želatine za proširenje asortimana veganskih proizvoda, iii) redukciju kalorijske vrijednosti i iv) inovativne formulacije proizvoda dodane vrijednosti, a sve u cilju očuvanja zadovoljavajućih senzorskih karakteristika gotovog proizvoda (Anonymus, 2024d).

Uz tradicionalne bombonske proizvode, razvijena je i kategorija funkcionalnih bombonskih proizvoda. U odnosu na čokoladu i značajan utjecaj saharoze i kakaovog maslaca na njenu karakterističnu topljivost i teksturu, kod razvoja formulacija bombonskih proizvoda postoji velik broj mogućih pristupa, obzirom na neutralan matriks koji čini bombonski proizvod, mogućnost varijacija okusa, aroma i dobivanja specifičnih senzorskih karakteristika (Gupta, 2024).

Funkcionalni bombonski proizvodi dijele se obzirom na vrstu sastojka koji se u potpunosti ili djelomično zamjenjuje te vrstu bioaktivnog i/ili nutritivnog sastojka koji se uvodi u proizvod. Prilikom razvoja, najčešći su sljedeći tehnološki postupci:

- ✓ *supstitucija želatine* različitim vrstama škrobova i njihovih derivata te neškrobnim polisaharidima (Tarahi i sur., 2023a; Pereira i sur., 2022)

✓ *supstitucija ili redukcija šećera* korištenjem umjetnih sladila (aspartam, neotam, acesulfam K), prirodnih sladila (med, javorov sirup, agavin sirup, stevija) ili šećernih alkohola/poliola (maltitol, ksilitol, eritritol, izomalt) (Peteliuk i sur., 2021; Bartkiene i sur., 2018)

✓ *supstitucija sintetskih bojila i aroma* prirodno deriviranim iz voća, povrća, algi i aromatskog bilja (antocijani iz bobičastog i jagodičastog voća, betanini iz cikle, karotenoidi, klorofili) (Otálora i sur., 2019)

✓ *obogaćivanje hidrokoloidnog matriksa:*

- mikronutrijentima (vitaminima i mineralima) (Constantino i sur., 2023)
- proteinima (sojini proteini, različiti hidrolizati, proteini algi, proteini sjemenki lupine) (Bartkiene i sur., 2018)

- topljivim i netopljivim vlaknima s funkcijom prebiotika (fruktooligosaharidi, ksilooligosaharidi, arabinoksilani, galaktomanani, biljni egzudati) (Lele i sur., 2018)

- bioaktivnim spojevima i njihovim izvorima (biljni ekstrakti, voćne pulpe, egzokarpi, koncentrat voća, esencijalna ulja, ulja bogata nezasićenim masnim kiselinama i dr.) (Archaina i sur., 2019)

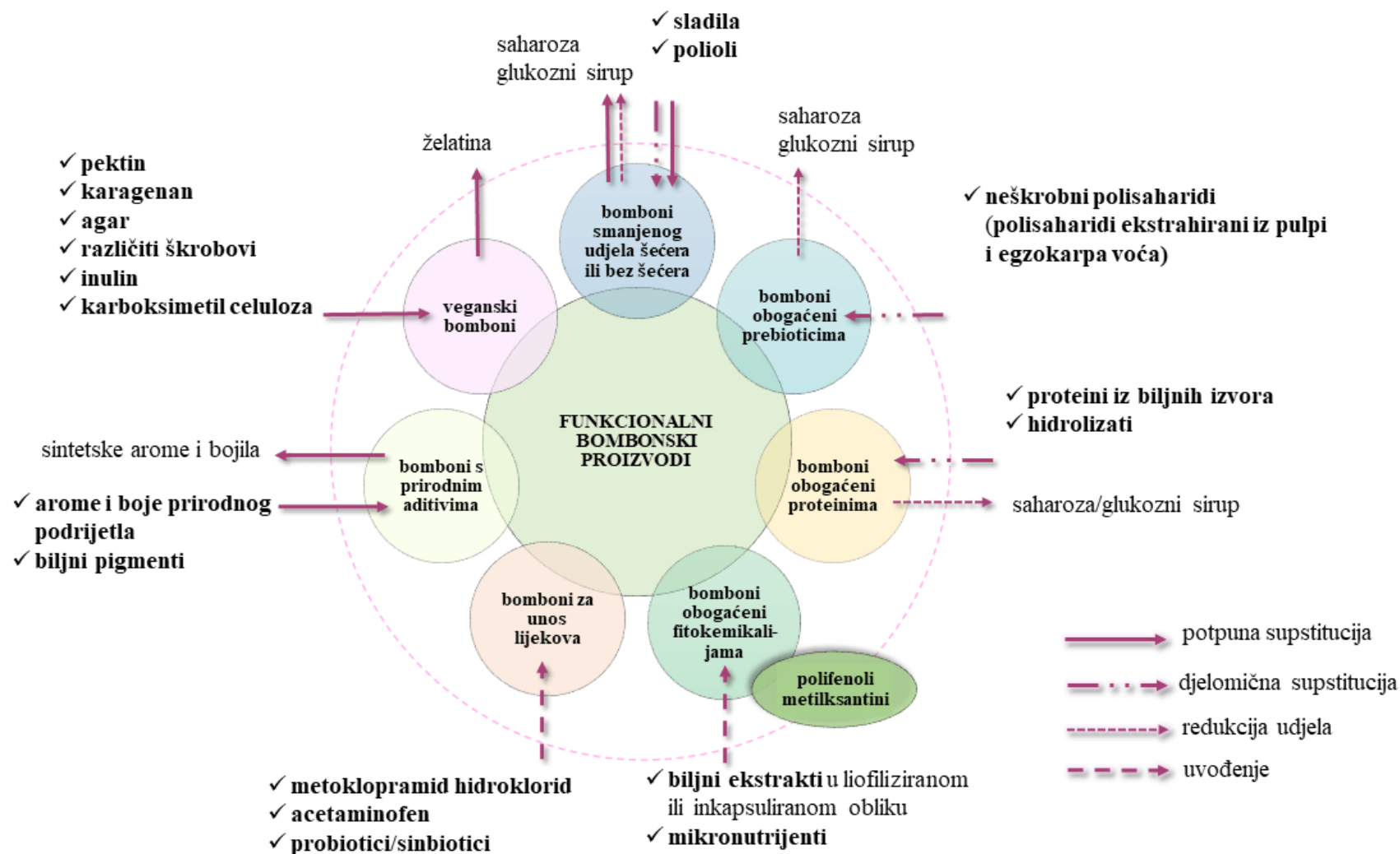
Uz kvalitativnu modifikaciju, u posljednje vrijeme se istražuje i primjena aditivne tehnologije (3D ispis) u razvoju autentičnih koncepata bombonskih proizvoda, s fokusom na optimizaciju reoloških parametara smjese za 3D ispis. Tako su Niu i sur. (2023) istražili mogućnost primjene gelan gume u modifikaciji viskoznosti i tvrdoće smjese za poboljšanje uspješnosti i preciznosti ispisa zadanog oblika gumenih bombona na bazi škroba. Nadalje, u radu Qiu i sur. (2024) uspješno je primijenjena polisaharidna guma piskavice u formiranju gelirajuće smjese obogaćene ekstraktom ruže za 3D ispis gumenih bombona na bazi kappa-karagenana. Premda ova tehnologija omogućuje personalizaciju proizvodnje i optimizaciju teksturalnih svojstava, značajan utjecaj reoloških svojstava smjese na uspješnost procesa i ograničenje u pogledu izvedivih kapaciteta proizvodnje trenutno predstavljaju glavne prepreke u komercijalizaciji (Hamilton i sur., 2018; Le i sur., 2022).

U Tablici 16 prikazan je literaturni pregled znanstvenih istraživanja u proteklih pet godina na temu formuliranja funkcionalnih bombonskih proizvoda.

Tablica 16. Literaturni primjeri formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda objavljeni u posljednjih pet godina

| Funkcionalni bombon | Funkcionalne komponente | Hidrokoloidi/specifičnosti recepture | Referenca |
|---|---|--|-----------------------------|
| bomboni obogaćeni prebiotikom | β -glukan proizveden pomoću <i>Aureobasidium thailandense</i> | želatina (8 %) + β -glukan (0,5 %) | Kayanna i sur. (2022) |
| bomboni obogaćeni biljnim ekstraktom | ekstrakt crvenog luka u saharoznoj otopini (38-60 %) | želatina (4-7,7 %) + agar (3,8-2 %), dodatak tamarind paste (15 %), 2,36-6,25 puta veći AC_{DPPH} u odnosu na kontrolu | Abinaya i sur. (2023) |
| karamel i čokoladni bomboni na bazi oleogelova, obogaćeni biljnim ekstraktima i nezasićenim masnim kiselinama | oleogel na bazi uljane repice, proteina sirutke, kazeina, maltodekstrina i škroba, vodena faza na bazi biljnih ekstrakata | želatina (6,84 %) + oleogel (10 %), voćni sok palme i voćni sok mrkve (2 %) ulje mrkve i ekstrakt palma dum ploda (<i>Hyphaene thebaica</i>) (0,8 %) | Salama i Hashim (2022) |
| bombon obogaćen probiotikom i prirodnom aromom | inkapsulirana bakterijska kultura <i>Limosilactobacillus reuteri</i> +esencijalno ulje limunske trave | želatina + arapska guma | do Nascimento i sur. (2023) |
| bombon bez šećera obogaćen proteinima | okara protein kao nusprodukt proizvodnje sojinog mlijeka i tofua)+ksilitiol | želatina:modificirani škrob u različitim omjerima, otopina okara proteina (4 %), dodatak mliječne kiseline | Liu i sur. (2023) |
| bombon obogaćen voćnim pireom | voćni pire+pektin iz kore tropskog voća <i>Garcinia atroviridis</i> , želatina iz kože atlantskog lososa | želatina (8,5-9,5 %) + pektin (0,5-1,5 %), AC_{DPPH} (0,29-0,30 mg ekv. AAE g^{-1} s. tv. bombona | Renaldi i sur. (2022) |
| veganski bombon obogaćen polisaharidima | prah egzokarpa japanske lubenice, 5 različitih polisaharida | agar (0,5 i 1 %) + pektin (0,541%) + arapska guma (0,541 %) + škrob (0,18 %), udjel praha (20-50 %) | Tarahi i sur. (2023b) |
| veganski bombon | KC u kombinaciji s 5 neškrobnih polisaharida | KC (2 %) + KGM, KMC, XAN, PEC i LBG (0,5 %) KC (2 %) + KMC (0,4-1,2 %) | Song i sur. (2022) |
| veganski bombon obogaćen antioksidansima | agar i guar guma kao zamjena za želatinu, prah kurkume (2-4 %) i crnog papra (0,2-1 %) | agar (4-6%) + guar guma (5-7 %) + njihove kombinacije | Rawat i sur. (2024) |
| bombon bez šećera, obogaćen proteinima, voćnom pulpom | polioli kao zamjena za šećer, spirulina kao izvor proteina, dodana liofilizirana acai pulpa kao izvor antioksidansa | želatina (10 %), maltitol (31-33 %), eritritol i izomalt (12,5-14 %), spirulina (1-5 %), acai pulpe (1-5 %) | Paternina i sur. (2022) |

AC-antioksidacijski kapacitet; AAE-ekvivalent askorbinske kiseline; KC-kappa-karagenan; KGM-glukomanani konjak gume; KMC-Na-karboksimetil celuloza; XAN-ksantan guma; PEC-pektin; LBG-lokust guma



Slika 17. Moguće strategije ili njihove kombinacije pri razvoju formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda (prema Tarahi i sur., 2023a).

Gumeni i žele proizvodi su najčešće konzumirani bombonski proizvodi na globalnom tržištu obzirom na široku mogućnost diverzifikacije u proizvodnji i inkorporacije različitih prehrambenih sastojaka (Gupta i sur., 2024).

Žele i gumeni proizvodi pripadaju kategoriji bombonskih proizvoda dobivenih od šećera i sredstava za želiranje i drugih sirovina koje im daju odgovarajuću konzistenciju (Pravilnik, NN 73/2005) i, premda se isto definiraju, u tradicionalnom smislu proizvodnja gumenih bombona podrazumijeva upotrebu želatine za formiranje hidrokoloidne mreže u cilju stabilizacije šećernog sirupa s relativno visokim udjelom vlage, dok se kod žele proizvoda koriste ostali hidrokoloidi, poput arapske gume, pektina, škroba, agar-agra i sl.

Žele proizvodi su bombonski proizvodi na bazi hidrokoloida (tj. sredstva za želiranje/stabilizatori) sa relativno visokim udjelom vode (16-20 %). Umrežavanjem polimernih lanaca hidrokoloida u disperznom sredstvu (vodene otopine u ovom kontekstu) stvara se hidrofilni koloid-gel. Fizikalno-kemijske karakteristike gela značajno ovise o tipu i kombinaciji korištenih hidrokoloida, s direktnim utjecajem na teksturu formirane hidrokoloidne mreže u kojoj je “zarobljena” hidrofilna otopina šećera i/ili poliola, odnosno sladila. Tekstura formiranog gela primarno je definirana prirodom intermolekularnih interakcija pri čemu je moguće dobiti polučvrsti ili čvrsti gel matriks, ovisno o prisutnosti slabijih kemijskih veza ili jakih, kovalentnih interakcija. Kombinacija različitih hidrokoloida omogućuje profinjeniju optimizaciju teksture gela, obzirom na rast kompleksnih interakcija unutar samog gel matriksa (Hartel i sur., 2018).

Saharoza u kombinaciji s *glukožnim sirupom* najčešće se koristi u izradi klasičnih žele proizvoda obzirom na teksturalnu kvalitetu finalnog gela i najpoželjnija senzorska svojstva. Udjel saharoze na suhu tvar gotovog proizvoda uglavnom iznosi 40-50 %, dok je udjel glukoznog sirupa 50-60 %. Najčešće se koristi glukozni sirup dekstroznog ekvivalenta (DE) 42 ili 63. Izbor glukoznog sirupa određenog DE ovisi o željenoj teksturi proizvoda, trajanju i uvjetima skladištenja te profilu slatkoće proizvoda. Primjerice, ukoliko se želi postići mekša tekstura gela s produljenim rokom trajanja, koristi se glukozni sirup višeg DE. Uz saharozu i glukozni sirup, u formulacijama smanjene kalorijske vrijednosti koriste se *polioli* poput maltitola i sorbitola, polidekstroze, vrlo često u kombinaciji sa *umjetnim sladilima* (Hartel i sur., 2018).

Najčešće korišteni *hidrokoloidi* su: visoko i nisko-metilirani pektin, škrob, agar, karagenan ili arapska guma. Izbor stabilizatora značajno utječe na čvrstoću gela, senzorski profil i uvjete skladištenja (Tablica 17).

Tablica 17. Svojstva najčešćih hidrokoloida biljnoga podrijetla korištenih u izradi žele bombona (Carr i sur., 1995)

| | Škrob | Pektin (HM) ^a | Agar-agar | Arapaska guma |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------|---------------|
| udjel (%) | 10-30 | 1-2 | 1-2 | 20-50 |
| T želiranja (°C) | 20-35 | 75-85 | 35-40 | 20-35 |
| vrijeme želiranja (h) | 12 | 1 | 12-16 | 24 |
| izgled gela | mutan, mat | proziran | proziran | proziran |
| tekstura | mekana prema čvrstoj, žvakljiva | nježna, kratka | nježna, kratka | čvrsta, tvrda |

^a visoko-metilirani pektin

Škrob je jedan od najčešće korištenih hidrokoloida u kombinaciji sa želatinom, ili kao alternativa želatini u proizvodnji veganskih žele proizvoda. Premda je najčešće korišteni kukuruzni škrob, populariziraju se i druge vrste poput krumpirovog, tapioka, pšeničnog, visoko amiloznog, aru škroba i sl., obzirom na željena funkcionalna svojstva gela (Tablica 18).

Tablica 18. Neka funkcionalna svojstva najčešće korištenih vrsta škrobova (Hartel i sur., 2018)

| | Kukuruzni škrob | Tapioka škrob | Krumpirov škrob | Pšenični škrob | Visoko amilozni škrob |
|---------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------------|-----------------------------------|
| udio amiloze | 27 | 17 | 20 | 27 | 55 |
| karakteristike gela | čvrsti gel | slabi gel | polučvrsti gel | slabi gel | vrlo čvrsti gel |
| prozirnost gela | neproziran | proziran | proziran | umjereno neproziran | neproziran, naglašene zamućenosti |
| brzina geliranja | umjerena | umjerena | umjerena | umjerena | vrlo brza |

Ključan korak u stvaranju karakterističnog škrobnog gela je želatinizacija škroba. Prilikom ovog procesa, dolazi do gubitka native strukture škrobnih granula u prisutnosti dovoljne količine vode i unutar određenog temperaturnog intervala. Zagrijavanjem, škrobne granule apsorbiraju vodu i bubre do određene granice, pri čemu dolazi do tzv. ekspanzije granula, odnosno gubitka kristalne strukture i prelaska u amorfnu i visokopastoznu suspenziju, sastavljenu od otopljenih molekula amiloze i amilopektina i neotopljenih dijelova granula (Svihus i sur., 2005). Hlađenjem, dolazi do retrogradacije odnosno djelomične rekristalizacije iz amorfne strukture u relativno uređenije kristalno stanje formiranjem gela (Fennema, 2008). Varijacija u teksturi gela postiže se pravovaljanim izborom škroba ovisno o udjelu amiloze i amilopektina, prethodnom procesiranju, tj. modificiranju škroba, kao i udjelu vode i korištenog

šećera, poliola i/ili nekog drugog sladila. Obzirom na dugolančanu i kompaktnu strukturu amiloze te niži kapacitet apsorpcije vode, visokoamilozni škrobovi zahtijevaju više energije, tj. šire temperaturne intervale želatinizacije i osiguravaju strukturno mekše gelove, slabije čvrstoće (Biduski i sur., 2018).

Kudzu (*Pueraria morata*) je biljna vrsta iz roda mahunarki podrijetlom iz Kine. Korijen biljke tradicionalno se koristi u azijskim zemljama kao prehrambeni izvor škroba ili u obliku napitka s antioksidacijskim (Son i sur., 2019), imunoprotektivnim (Lim i sur., 2013), estrogenim (Ahn i sur., 2019), antidijabetskim (Sun i sur., 2019) i dr. bioaktivnim učincima uslijed prisutnosti izoflavonoida. Udjel škroba u korijenu kudzu-a značajno je sezonski ovisan i može doseći do 52 %. Korijen se bere u studenom, a Kina, Japan i ostale zemlje istočne Azije su glavni komercijalni proizvođači kudzu-a (Rashid i sur., 2017).

Izolacija škroba provodi se tradicionalnom metodom precipitacije koja uključuje: pranje korijena vodom, guljenje, mljevenje, uzastopnu filtraciju neškrobnih komponenti, precipitaciju vodom, sušenje i pakiranje (Xu i sur., 2015). U suštini, ova metoda iskorištava netopljivost škrobne frakcije u hladnoj vodi za razdvajanje od ostalih vodotopljivih komponenti iz matriksa. Komercijalni kudzu škrob karakterizira visoka čistoća te sličan udjel amiloze kao i u kukuruznom škrobu (22-23 %) (Zhang i sur., 2015). Nativni kudzu škrob karakterizira veća transparentnost u odnosu na kukuruzni škrob i niža u odnosu na krumpirov škrob (Zhang i sur., 2018), slaba stabilnost pri zamrzavanju (Zeng i sur., 2019) i relativno visok stupanj retrogradacije u odnosu na, primjerice, krumpirov škrob (Yoo i sur., 2009). Smatra se funkcionalnom komponentom obzirom na visoki udjel rezistentnog škroba (Guo i sur., 2016). Sporija probavljivost može biti povezana s udjelom amiloze, kristaliničnošću granula i distribucijom duljine amilopeptidskih lanaca (Guo i sur., 2016; Guo i sur., 2018).

Kudzu škrob ima potencijalnu primjenu kao stabilizator, inkapsulacijski nosač, modifikator teksture ili kao emulgirajući agens za emulzije tipa ulja u vodi (Zhao i sur., 2017a). Često se dodaje u zamjese za azijske rezance, pudinge i mliječne jogurte u cilju postizanja profinjenije teksture (Liang i sur., 2017; Imamoglu i sur., 2017; Romanchik-Cerpovicz i sur., 2020). Sve se više istražuju enzimске, i kemijske modifikacije za poboljšanje topljivosti i emulgiranja, modifikaciju viskoznosti, temperature želatinizacije, stupnja retrogradacije i sl., a sve u cilju proširenja komercijalne primjene u različite prehrambene proizvode (Guo i sur., 2018; Zhao i sur., 2017b).

Organske kiseline su komponente u bombonskoj smjesi dodane na kraju procesa, a značajno doprinose poboljšanju senzorskog profila i komplementiranju voćnih aroma. Najčešće se dodaje limunska kiselina u udjelu < 2 %. Zakiseljavanje hidrokoloidne suspenzije osobito je

bitno prilikom korištenja HM pektina jer do formiranja gela zadovoljavajuće konzistencije dolazi tek pri nižim pH vrijednostima (Hartel i sur., 2018).

Boje i arome također se dodaju u finalnoj fazi, nakon izrade i djelomičnog hlađenja bombonske smjese u udjelima manjim od 0,2 %. Zahtjevi koje ove komponente moraju ispunjavati je: stabilnost pri niskim pH vrijednostima i relativno visokim temperaturama te kemijska inertnost (Hartel i sur., 2018). U Tablici 19 prikazani su udjeli pojedinačnih sastojaka za proizvodnju žele bombona na bazi škroba koji mogu poslužiti za daljnju optimizaciju željenih receptura.

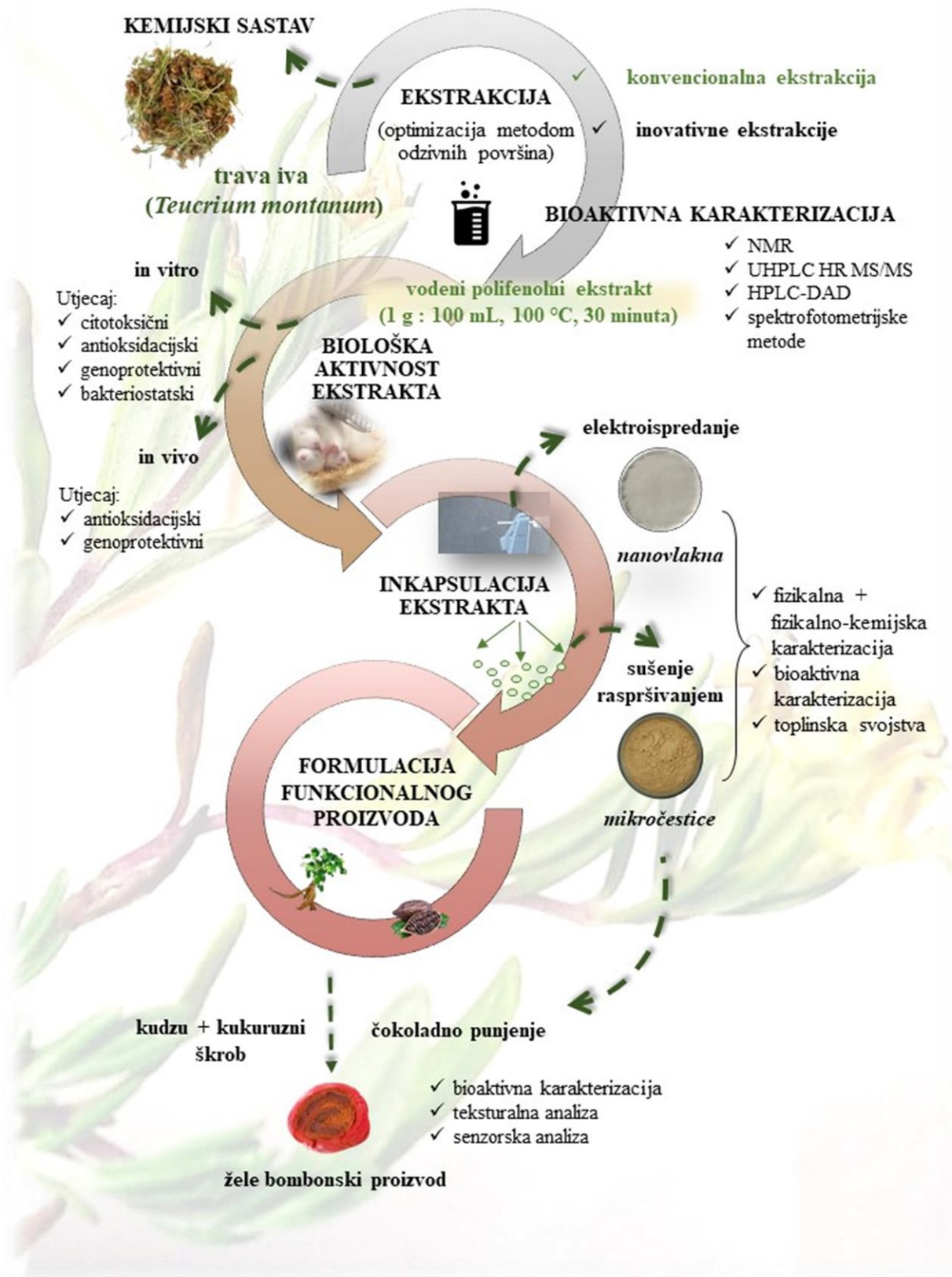
Tablica 19. Primjer formulacije za proizvodnju žele proizvoda na bazi škroba (Hartel i sur., 2018)

| Sastojak | Udjel (%) |
|-------------------------------------|-----------|
| Glukočni sirup (62 DE) ^a | 45-50 |
| Saharoza | 25-35 |
| Voda | 9-14 |
| Škrob ^b | 9-12 |
| Kiselina | 0.5-1,0 |
| Aroma | 0,25-0,5 |
| Boja | 0,1-0,3 |

^a udjel vode: 20 % ; ^b visokoamilozni škrob

Faze proizvodnje uključuju: pripremu suspenzije škroba u vodi, ukuhavanje šećernog sirupa i suspenzije škroba do određenog udjela suhe tvari (77-78 %), dodavanje arome, boje i kiseline, homogenizacija, izlijevanje u škrobne kalupe, sušenje i odležavanje pri definiranim uvjetima temperature i relativne vlažnosti. Dvije su najčešće metode izrade žele mase: 1) kuhanje u otvorenim kotlovima i 2) kuhanje u kontinuiranom uređaju pod visokim tlakom (Goldoni, 2004).

EKSPERIMENTALNI PLAN ISTRAŽIVANJA



3. Materijali i metode

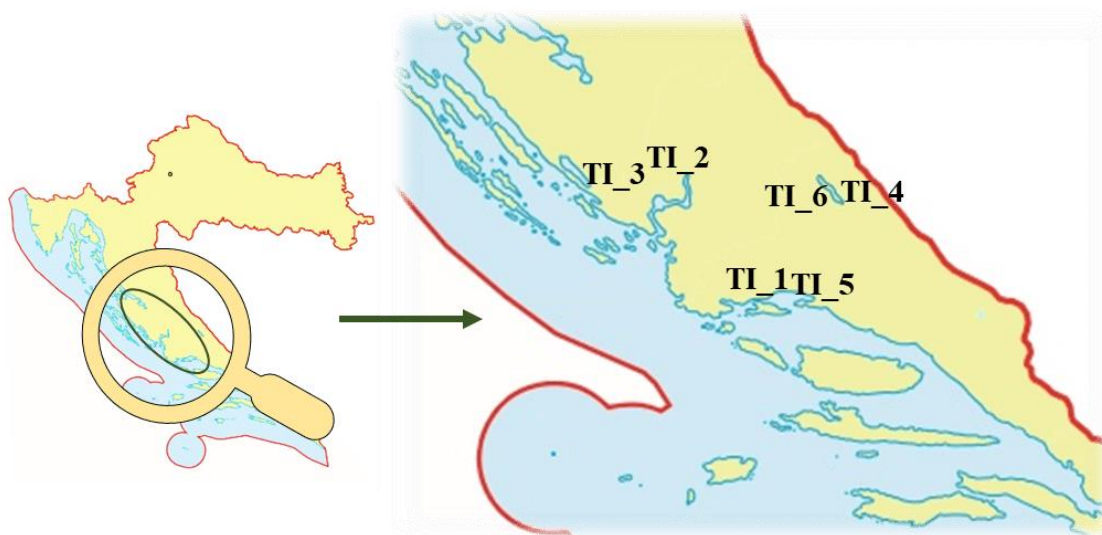
3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom istraživanju korišten je nadzemni dio biljne vrste trave ive (*T. montanum*) sakupljene s šest mikrolokacija u Primorskoj Hrvatskoj (Tablica 20). Četiri uzorka sakupljena su u Splitsko-dalmatinskoj, a dva u Šibensko-kninskoj županiji, kako je označeno na Slici 18.

Tablica 20. Geografske lokacije korištenih biljnih uzoraka i herbarijski podaci

| Biljni uzorak | Geografska (mikro)lokacija | Lokacija i ID pohranjenog herbarijskog primjerka |
|---------------|--|--|
| TI_1 | općina Seget, naselje Prapatnica | Herbarium Croaticum, ID:62598 |
| TI_2 | općina Kistanje, naselje Varivode | Herbarium Croaticum, ID:75518 |
| TI_3 | Općina Stankovci, naselje Stankovci | Herbarium Croaticum, ID:75520 |
| TI_4 | općina Hrvace, visoravan Vrdovo, 900 m nadmorske visine | Herbarium Croaticum, ID:62599 |
| TI_5 | općina Klis, kod prijevoja Malačka na brdu Kozjak, 477 m nadmorske visine | Herbarium Croaticum, ID:75519 |
| TI_6 | Svilaja, u okolici planinarskog doma Orlove stine, 1065 m nadmorske visine | Herbarium ZAGR, ID:75234 |



Slika 18. Označene geografske lokacije sakupljenih biljnih uzoraka trave ive.

Svi biljni uzorci stručno su potvrđeni i pohranjeni u sveučilišnoj herbarijskoj zbirci Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Biološkog odsjeka u Zagrebu (Herbarium Croaticum) te Agronomskog fakulteta u Zagrebu (Herbarium ZAGR).

Svi biljni uzorci pažljivo su sortirani, očišćeni od stranih primjesa, osušeni na prozračnom mjestu, zaklonjenom od sunca te skladišteni u papirnatim vrećama na suhom i hladnom mjestu. U cilju osiguranja homogenih i reprezentativnih uzoraka, biljni materijal je prethodno usitnjen te prosijan kroz metalno sito veličine pora 450 µm. U svim eksperimentalnim postupcima i analizama korištena je frakcija čestica veličine < 450 µm.

3.1.2. Biološki test sustavi

U istraživanju su korištene kontinuirane humane stanične linije, Gram-negativna i Gram-pozitivne bakterije i pokusne životinje.

3.1.2.1. Modelne makromolekule

Za ispitivanje prooksidacijskog učinka ekstrakta trave ive na DNK korišten je superzavijeni plazmid phiX-174 RF1 DNA.

3.1.2.2. Kontinuirane humane stanične linije

Za ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog učinka te oksidacijskog oštećenja ekstrakta trave ive korištene su stanične linije probavnog sustava i jetre: epitelni karcinom jezika (CAL 27; ATCC CRL-2095), i adenokarcinom želuca (AGS, ATCC CRL-1739), epitelni kolorektalni adenokarcinom (Caco-2; ATCC HTB-37) i hepatocelularni karcinom (HepG2; ATCC HB-8065).

3.1.2.3. Bakterijske kulture

Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta trave ive korišteni su sljedeći bakterijski sojevi: Gram-pozitivne *Lactobacillus plantarum* DSM 1055 i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 20231^T te Gram-negativna i patogena *Escherichia coli* K-12 MG1655. Navedeni bakterijski sojevi dio su Zbirke organizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a čuvaju se na -80 °C u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak krioprotektora. U nastavku teksta, za korištene radne mikroorganizme navodi se samo pripadajući rod i vrsta.

3.1.2.4. Hranjive podloge

Korištene su Luria-Bertani (LB) i De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) hranjive podloge te minimalna podloga s laktozom (M9) za uzgoj bakterijskih kultura, a kvalitativan sastav svake podloge nalazi se u Tablici 21.

Tablica 21. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterijskih kultura

| LB (Luria-Bertani) hranjiva podloga | |
|--|-------------|
| bakto-tripton | 10 g |
| kvašćev ekstrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| ultračista voda | do 1000 mL |
| MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) hranjiva podloga | |
| MRS Broth | 27,6 g |
| ultračista voda | do 1000 mL |
| *nalidiksinska kiselina | 300 μ L |
| M9-minimalna podloga s laktozom | |
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| NaCl | 0,5 g |
| NH ₄ Cl | 1 g |
| ultračista voda | do 1000 mL |
| ** 1 M otopina MgSO ₄ ×7 H ₂ O | 2 mL |
| ** 1 M otopina CaCl ₂ | 100 mL |
| ** 20 % laktoza | 10 mL |
| ** tiamin (2 mg mL ⁻¹) | 1 mL |

*dodaje se nakon sterilizacije u ohlađenu hranjivu podlogu; **dodaju se nakon sterilizacije u ohlađenu hranjivu podlogu kao sterilne i profiltirirane otopine (veličina pora=0,45 μ m) pripremljene u ultračistoj vodi

3.1.2.5. Pokusne životinje

Za ispitivanje oksidacijskog stresa i genotoksičnog oštećenja ekstrakta trave ive na *in vivo* modelu su korišteni štakori ženki i mužjaka soja Sprague Dawley, u dobi od oko tri mjeseca, uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska). Ženke (prosječna masa oko 250 g) i mužjaci (prosječna masa oko 350 g) bili su podijeljeni u četiri test grupe ženki i mužjaka po četiri štakora u svakoj, uključujući i kontrolne grupe. Eksperimentalne životinje bile su smještene u standardnim kavezima i hranjene su standardnom hranom (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija) uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*, a držane su u standardnim uvjetima (dnevni ritam od 12 sati svjetla i 12 sati mraka, 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka). Njega životinja i cjelokupni eksperimentalni protokol izvršen na

životinjama proveden je u skladu sa trenutnom važećim Zakonom o zaštiti životinja (Zakon, NN 102/2017) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Pravilnik, NN 55/2013). *In vivo* eksperimentalni prijedlog odobren je od strane Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (274/2019) i Ministarstva poljoprivrede (broj odobrenja: HR-POK-012).

3.1.3. Sirovine korištene u proizvodnji funkcionalnih bombonskih proizvoda

Za formulaciju receptura punjenih žele bombonskih proizvoda korištene su sljedeće sirovine: komercijalni kukuruzni škrob Dr. Oetker (Mađarska), kudzu škrob Clearspring Organic Japanese Kuzu (Velika Britanija), glukozni sirup dekstroznog ekvalenta 42 Fractal (Mađarska), hladno prešano kokosovo ulje Ekoplaza (Nizozemska), shea maslac Agava Karin Lang (Njemačka), liofilizirane maline Dennree (Njemačka), limunska kiselina Šafram d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), glycerol (85 %-tni w/w, iz Gradske Ljekarne Zagreb (Hrvatska). Tamna čokolada za proizvodnju pralina s 52 %-tnim udjelom kakaovih dijelova, prirodna aroma maline i prirodno crveno bojilo donirani su iz Kraš prehrambene industrije d.d. (Hrvatska).

3.1.4. Kemikalije

Analitički standardi

- Akacetin (> 99 %), Biosynth, Slovačka
- Apigenin (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Diosmetin (> 95 %), Biosynth, Slovačka
- Ehinakozid (> 98 %), Biosynth, Slovačka
- Galna kiselina (99 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kafein, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Teobromin (> 99 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Verbaskozid (> 98 %), Biosynth, Slovačka

Enzimi i enzimski setovi

- Glutation reduktaza, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Humana α -amilaza XII-A (1149 U mg⁻¹ proteina), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pankreatin iz svinjske gušterače (4×USP), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pepsin iz svinjske želučane sluznice (\geq 474 U mg⁻¹ proteina), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Set za određivanje amiloze i amilopektina, K-AMYL, Megazyme, Irska

- Set za određivanje ukupnih vlakana, K-TDFR-200A, Megazyme, Irska
- Žuč podrijetlom iz goveda, Sigma-Aldrich, Njemačka

Ostale kemikalije

- 2-tiobarbiturna kiselina, Carlo Erba Reagents GmbH, Njemačka
- ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina] diamonijeve soli), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Aceton, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Acetonitril, Fischer Scientific, SAD
- Agar, Biolife, Italija
- Agarozna niske točke tališta (LMP), Invitrogen, Velika Britanija
- Agarozna normalne točke tališta (NMP), Lonza, SAD
- Albumin iz goveđeg seruma (BSA), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Amonijev karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Amonijev klorid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Arapska guma, Alfa Aesar, Njemačka
- Askorbinska kiselina, Kemika d.d., Hrvatska
- Bakrov sulfat pentahidrat, Acros Organics, SAD
- Bakto-tripton, Biolife, Italija
- Borna kiselina, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Bromkrezol-zeleno, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Bromtimol plavo, Kemika d.d., Hrvatska
- Celit 545, Merck, Njemačka
- DCFH-DA (2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Deuterirani metanol, (CD₃OD, 99,8%), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika d.d., Hrvatska
- Dinatrijev fosfat, Fisher Scientific, Engleska
- Djelomično hidrolizirana guar guma, Palco Nutrifit d.o.o., Hrvatska
- DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Dušična kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska

- Etidijev bromid, Sigma Aldrich, Njemačka
- Etilni acetat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d., Hrvatska
- Glicerol, Kemika d.d., Hrvatska
- Gvanidin hidroklorid, Sigma Aldrich, Njemačka
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Hidrolizirani kolagen, Biosynth, Slovačka
- Izolat proteina konoplje (čistoća: 70 %), Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- Izooktan, Fischer Scientific, UK
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Kalij natrij tartarat tetrahidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Kalijev bromid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev dihidrogen fosfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev hidroksid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kappa-karagenan, Gelymar, Čile
- Karboksimetil celuloza, Biosynth, Slovačka
- Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selen), Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka
- Kloroform, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Klorovodična kiselina (37%, v/v), Kemika d.d., Hrvatska
- Kvaščevo ekstrakt, Biolife, Italija
- Ledena octena kiselina, Kemika d.d., Hrvatska
- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Magnezijev sulfat heptahidrat, Kemika d.d., Hrvatska
- Manitol, Difco, SAD
- Metanol, J.T. Baker, SAD
- Metil-crveno, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Mravlja kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- MRS Broth, Biolife, Italija
- NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat), AppliChem GmbH, Njemačka
- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), Sigma-Aldrich, Njemačka

- Natrijev hidrogen fosfat, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev hidrogen karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Natrijev hidrogensulfit, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev laurilsarkozinat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Natrijeva sol alginatne kiseline (iz smeđih algi; niske viskoznosti), Sigma-Aldrich Njemačka
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Sigma-Aldrich, Njemačka
- n-heksan, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Octena kiselina, J.T. Baker, SAD
- *Orto*-fosforna kiselina (85 %, v/v), Kemika d.d., Hrvatska
- Perklorna kiselina, Fisher Scientific, Engleska
- Pululan, Biosynth, Slovačka
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, Corning, SAD
- Sumporna kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- Suncokretov lecitin, NUTRIMEDICA d.o.o., Hrvatska
- Trikloroctena kiselina, Fisher Scientific, Engleska
- Tripsin, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tris-HCl, Invitrogen, SAD
- Triton X-100, Acros Organics, SAD
- Trizma® Base, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) (> 98 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Zein, Acros Organics Bvba (Geel, Belgija)
- Željezov(III) klorid, Kemika d.d., Hrvatska

3.1.5. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, New Classic MF, Mettler Toledo AG, Švicarska
- Analitički sakupljač frakcija Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, SAD

- ATR-FT-IR spektroskop, Nicolet iS10, Thermo Scientific, SAD
- Blok za spaljivanje i aspiracijski modul, Tecator, Foss, Danska
- Centrifuga SL8/8R, Thermo Scientific, SAD
- Digitalni termometar, 108-2, Testo, Njemačka
- Digitalni uređaj za mjerenje gustoće DMA 1001, Anton Paar, Austrija
- Električni mlin, United Favor Development, Kina
- Električni mlinac United Favour Development, Hong Kong
- Električno kuhalo, Iskra Slovenija
- Epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Njemačka
- Goniometar, DataPhysics OCA 20, Njemačka
- ICP-AES instrument (atomska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu), Mason, SAD
- Inkubator s kontroliranom CO₂ atmosferom, Forma Scientific, SAD
- Invertni svjetlosni mikroskop, Optika Microscopes, Italija
- Kjeltec 2100 uređaj (destilacijska jedinica Kjeldahl), Foss, Danska
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, Iskra, Slovenija
- Konduktometar Lab 945, Xylem Inc., SAD
- Liofilizator, Christ, Alpha 1-LSC, Martin Christ, Njemačka
- Liofilizator, Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ, Njemačka
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH, Njemačka
- Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern, Velika Britanija
- Malvern Zetasizer Ultra, Malvern, Velika Britanija
- Maseni spektrometar Agilent 6550 s ionizatorom elektroraspršivanjem (ESI) i kvadrupolskim analizatorom u kombinaciji s analizatorom vremena preleta (Q-TOF), spregnut s analitičkim tekućinskim kromatografom Agilent 1290 Infinity II LC, Agilent Technologies, SAD
- Minicentrifuga D1008, DLABScientific, SAD
- Modularni kompaktni reometar, MCR 102 (Anton Paar; Graz, Austrija) s pripadajućim mjernim tijelima
- Mufolna peć KR-170, Heraeus, Njemačka
- NMR spektrometar Avance Neo 600 MHz opremljen s 5 mm Prodigy krioprobom (CPP1.1.TCI 600S3 H&F-C/N-D-05 Z XT), Bruker, SAD
- Plinski kromatograf ATI Unicam 610, Velika Britanija

- Preparativni tekućinski kromatografski sustav 1260 Infinity II, Agilent Technologies, SAD
- Razlikovni pretražni kalorimetar, Mettler Toledo DSC 823e, Švicarska
- Rotacioni vakuum uparivač RV8, IKA, Njemačka
- SEM mikroskop TESCAN Mira3, Češka Republika
- Spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica Model 550 (Bio-Rad, SAD)
- Spektrometar cirkularnog dikroizma i optičke rotacijske disperzije J-815, Jasco, Japan
- Sušionik, Instrumentaria, Hrvatska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd, Velika Britanija
- Svjetlosni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Tehnička vaga, A&D Instruments, Velika Britanija
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies, SAD
- Temperaturna sonda, model prema serijskom broju magnetske mješalice (Witteg Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Texture Analyzer TA.HD.plus, Stable Micro System, Velika Britanija
- Torziona vaga K100, Krüss, Njemačka
- Ultracentrifuga Mikro 200R (Hettich, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma, Njemačka
- Ultrazvučni homogenizator Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) s pripadajućom sondom MS73
- Uređaj za ekstrakciju subkritičnom vodom, Đuro Đaković Aparati d.o.o. (opisan u radu Jokić i sur., 2018), Hrvatska
- Uređaj za elektroforezu, Life Technologies, SAD
- Uređaj za elektroispredanje Spinbox, Bioinicia, Španjolska
- Uređaj za ispitivanje teksture TA.HD.plus, Stable Micro Systems, Velika Britanija
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz hrane, Ethos Easy, Italija
- Uređaj za sušenje raspršivanjem, mini Büchi B-290, Büchi Labortechnik, Švicarska
- UV-Vis spektrofotometar Genesys 10S, Thermo Scientific, SAD
- UV-Vis spektrofotometar Libra S22, Biochrom, Velika Britanija
- Vodena kupelj Inko VKZ ERN, Inkolab d.o.o., Hrvatska
- Vortex (MX-S), DLABScientific, SAD
- Zamrzivač Ultralow temperature freezer, New Brunswick scientific Co., SAD

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje kemijskog sastava trave ive

Većina analiza za definiranje osnovnog kemijskog sastava (udjel osnovnih makrokomponentata) trave ive provedena je prema standardnim AOAC metodama, a uključivala je određivanje udjela: (i) suhe tvari - gravimetrijski, sušenjem pri 105 °C do konstantne mase (AOAC 930.15; Padmore (1990a)); (ii) proteina-poluautomatiziranom metodom po Kjeldahlu (AOAC 976.05; Padmore (1990b)); (iii) lipida-gravimetrijski nakon ekstrakcije u aparaturi po Soxhletu (AOAC 920.39; Padmore (1990c)); (iv) mineralnog ostatka-gravimetrijski nakon suhog spaljivanja (AOAC 942.05; Padmore (1990d)) te (v) topljivih i netopljivih, odnosno ukupnih vlakana velike molekulske mase-enzimsko-gravimetrijskom integriranom metodom (McCleary i sur. (2012)). Sastav makro- i mikroelemenata prisutnih u biljkama analiziran je atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP - AES) prema metodi Vihnanek Lazarus i suradnika (2013). Sakupljenim lipidnim frakcijama dodatno je analiziran sastav i zastupljenost masnih kiselina prevođenjem u metilne estere prema standardnoj metodi HR 14103 (2020).

3.2.2. Karakterizacija polifenolnog sastava trave ive

3.2.2.1. Optimizacija uvjeta ekstrakcije polifenolnih spojeva

Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz trave ive korištene su tri ekstrakcijske tehnike: konvencionalna ekstrakcija zagrijavanjem (eng. HAE, *heat-assisted extraction*) i dvije inovativne tehnike-ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. MAE, *microwave-assisted extraction*) i ekstrakcija subkritičnom vodom (eng. SWE, *subcritical water extraction*). U cilju optimiranja uvjeta pojedine tehnike, primijenjena je metoda odzivnih površina (eng., *response surface methodology*, RSM) u softverskom paketu Design Expert. Provedeno je ukupno 16 eksperimenata s dvije replicirane centralne točke za svaku ekstrakcijsku tehniku (Tablica 22). Definirane su nezavisne varijable (temperatura, omjer uzorka i otapala te vrijeme) dok su zavisne varijable određene spektrofotometrijskim metodama određivanja ukupnih polifenola (udjel ukupnih polifenola i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određen DPPH i ABTS metodom). Za sve ekstrakcijske tehnike, odvagano je po 1 g biljnog materijala uzorka TI_5 u Falcon epruvete te je dodan volumen destilirane vode prema zadanim omjerima. HAE provedena je u vodenoj kupelji, MAE u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju pri 900 W sa

precizno reguliranom temperaturom *in situ* i konstantnim miješanjem, dok je SWE provedena u šaržnom sustavu kapaciteta 75 mL, uz kontrolu tlaka i uklanjanje kisika pomoću dušika te konstantno miješanje. Nakon svih provedenih eksperimenata za sve tehnike, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu, profiltrirani pomoću filter papira (Whatman No.5), uz naknadno ispiranje preostalog taloga u dva obroka po 2 mL i mjerenje konačnog volumena ekstrakta pomoću menzure. Svi uzorci su čuvani na -18 °C do analiza.

Tablica 22. Eksperimentalni plan za optimizaciju pojedine ekstrakcijske tehnike

| Ekstrakcijska tehnika | Nezavisne varijable | | | Zavisne varijable |
|-----------------------|-----------------------------------|---|--------------------------------|---|
| | X ₁ : Temperatura (°C) | X ₂ : Omjer uzorka i otapala (g mL ⁻¹) | X ₃ : Vrijeme (min) | Y: Ekstrakcijska učinkovitost |
| HAE | 80 | 1:25 | 10 | TPC (u mg ekv. GAE g ⁻¹) |
| | 90 | 1:40 | 15 | |
| | 100 | 1:100 | 30 | |
| MAE | 50 | 1:25 | 5 | ABTS (u mM ekv. TE g ⁻¹) |
| | 70 | 1:40 | 7 | |
| | 90 | 1:100 | 9 | |
| SWE | 120 | 1:25 | 5 | DPPH (u mM ekv. TE g ⁻¹) |
| | 160 | 1:40 | 10 | |
| | 200 | 1:100 | 15 | |

HAE-konvencionalna ekstrakcija uz zagrijavanje; MAE-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija; SWE-ekstrakcija subkritičnom vodom; GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-ekvivalenti Troloxa

3.2.2.2. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Udjel ukupnih polifenola u ekstraktima trave ive određen je korištenjem modificirane metode prema radu Singleton i Rossi (1965). Otpipetira se 100 µL uzorka, 7,9 mL destilirane vode, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog s vodom (1:2, v/v) i 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (w/v), a apsorbancija reakcijske smjese mjeri se nakon 2 sata pri valnoj duljini od 765 nm u odnosu na slijepu probu. Prema baždarnom pravcu, konstruiranom iz baždarne krivulje za otopine galne kiseline u definiranom koncentracijskom rasponu (25-250 µg mL⁻¹), izračuna se udjel ukupnih polifenola (TPC) koji se izražava u mg ekv. GAE g⁻¹ s. tv. (na suhu tvar početnog biljnog materijala).

3.2.2.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima trave ive određen je korištenjem modificirane metode prema radu Re i sur. (1999). Najprije se pripremi otopina ABTS•+ radikala oksidacijom

vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do dobivanja 2,45 mM otopine kalijevog persulfata. Za reakciju se koristi razrijeđena etanolna otopina ABTS•+ radikala do koncentracije koja odgovara iznosu apsorbanije od $0,700 \pm 0,02$ pri 734 nm. Otpipetira se 20 μL uzorka i 2 mL pripremljene otopine ABTS•+ radikala, a apsorbanija reakcijske smjese mjeri se nakon 6 minuta pri valnoj duljini od 734 nm u odnosu na slijepu probu. Rezultati se izračunaju prema baždarnom pravcu za otopine Troloxa u definiranom koncentracijskom rasponu ($25\text{-}250 \mu\text{g mL}^{-1}$) i izražavaju u mM ekv. TE g^{-1} s. tv. (na suhu tvar početnog biljnog materijala).

3.2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Korištena je modificirana metoda prema radu Brand-Williams i sur. (1995). Otpipetira se 100 μL uzorka i 3,9 mL metanolne otopine DPPH (0,094 mM). Nakon 30 minuta, mjeri se apsorbanija reakcijske smjese pri valnoj duljini od 515 nm u odnosu na slijepu probu. Rezultati se izražavaju u mM ekv. TE g^{-1} s. tv. (na suhu tvar početnog biljnog materijala).

3.2.2.5. Identifikacija polifenolnih spojeva

3.2.2.5.1. Analiza spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

U svrhu dobivanja NMR spektara optimalne kvalitete, potrebno je izolirati polifenolne frakcije od interesa. Liofilizirani ekstrakt trave ive dobiven iz uzorka TI_2 (0,53 g) otopljen je u destiliranoj vodi (10 mL) i precipitiran etanolom (1:1, v/v). Nakon centrifugiranja, izdvojeni supernatant je profiltriran (RC-HPLC filteri, $0,20 \mu\text{m}$) i kao takav korišten za preparativno izdvajanje ciljanih spojeva. U tu svrhu korišten je preparativni tekućinski kromatograf (1260 Infinity II Manual Preparative LC System, Agilent Technologies, SAD) spregnut s DAD detektorom, a separacija spojeva je izvršena na semipreparativnoj C-18 kromatografskoj koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (L×I.D.: $250 \text{ mm} \times 9,4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ veličine pora, Agilent Technologies, SAD). Primijenjena je gradijentna elucija korištenjem mobilne faze A (1 %-tna mravlja kiselina u vodi, v/v) i mobilne faze B (1 %-tna mravlja kiselina u acetonitrilu, v/v), s optimiranim uvjetima metode kako slijedi: 0-1 minuta: 7 % B faza, 1-5 minuta: 7-15 % B faza, 5-18 minuta: 15-25 % B faza, 18-20 minuta: 25-40 % B faza, 20-23 minuta: 40-70 % B faza uz 5 minuta ekvibracije na početne uvjete mobilnih faza, temperatura: $25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok mobilne faze: 9 mL min^{-1} , volumen injektiranja: $400 \mu\text{L}$. Detekcija signala izvršena je pri maksimumu apsorpcije za ciljane spojeve (320 nm). u zasebne tikvice s okruglim dnom (50 mL) i koncentriran do suhog na rotacijskom uparivaču.

Dobivena tri najdominantnija spoja (uz ehinakozid i verbaskozid koji su prethodno identificirani pomoću analitičkih standarda) označena su kao PH5 (22,8 mg), PH6 (26,2 mg) i PH7 (26,1 mg). Priprema uzorka za NMR analizu uključivala je otapanje dobivenih spojeva u deuteriranom metanolu (600 μ L), prijenos u 5 mm cjevčicu NMR i snimanje ^1H , ^{13}C -DEPTq, COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC i NOESY spektara NMR. Svi 1D i 2D spektri snimljeni su korištenjem standardnih pulsnih programa na spektrometru opremljenom s krioprobom. Za NOESY spektre korišteno je vrijeme miješanja od 400 ms. Kao referentni signal korišten je ostatni signal metanol- d_4 otapala (3,31 ppm za proton i 49,15 ppm za ugljik). Eksperimentalni parametri (za sve snimljene spektre, kao i pripadajući spektri za svaki analizirani spoj, nalaze se u Prilozima (P1-P32). Za usporedbu i jednoznačnu strukturnu karakterizaciju spojeva, analitički standardi sa sličnim strukturama, odnosno ehinakozid i verbaskozid, analizirani su pri istim eksperimentalnim uvjetima.

3.2.2.5.2. Analiza spektrometrijom masa visoke rezolucije spregnutom s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS)

Prvi korak kod provođenja analize pomoću masene spektrometrije visoke razlučivosti uključivao je izolaciju polifenolnih frakcija korištenjem tekućinskog kromatografa Agilent 1200 Series spregnutog s analitičkim sakupljačem frakcija Agilent 1260 Infinity II. U tu svrhu korištena je C-18 stacionarna faza (Zorbax extend C-18, L \times I.D.: 250 mm \times 4,5 mm, 5 μ m veličina pora) pri gradijentnoj eluciji (mobilna faza A: 1 %-tna mravlja kiselina u vodi, v/v i mobilna faza B: 1 %-tna mravlja kiselina u acetonitrilu, v/v), kako je prikazano u Tablici 23.

Tablica 23. Udjeli mobilnih faza prilikom izdvajanja polifenolnih frakcija ekstrakta trave ive korištenjem analitičkog sakupljača frakcija u kombinaciji s HPLC-DAD metodom

| Vrijeme (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) |
|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 93 | 7 |
| 5 | 93 | 7 |
| 45 | 40 | 60 |
| 47 | 30 | 70 |
| 52 | 20 | 80 |

Ostali kromatografski uvjeti bili su redom: protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹, temperatura kolone-25 °C, volumen injektiranja: 20 μ L. Spojevi od interesa izdvojeni su primjenom opcije prepoznavanja prema specifičnom retencijskom vremenu (*eng.* timetable mode) pri valnim duljinama koje odgovaraju maksimumu apsorpcije pojedinih pikova eluiranih frakcija (260-

370 nm). Sve dobivene frakcije koje su sadržavale ciljani spoj spojene su u zasebne vijale, uparene na rotacijskom uparivaču te resuspendirane u 80 %-tnom acetonitrilu (*v/v*) kao priprema za sljedeći korak analize na masenom spektrometru.

Izdvojene polifenolne frakcije analizirane su na spektrometru masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) spregnutom s UHPLC sustavom Agilent 1290 Infinity II LC. Korištena je kromatografska kolona Zorbax SB-C18 (L×I.D.: 100 mm×2,1 mm, 1,8 μm veličina pora) (Agilent Technologies, SAD) i gradijentna elucija (A: 0,1%-tna mravlja kiselina u vodi te B: 0,1%-tna mravlja kiselina u acetonitrilu, *v/v*) prema kromatografskih uvjetima kako slijedi: 0-15 minuta: 5-95 % B, 15-17 minuta: 95 % B, temperatura kolone je bila 40 °C, protok mobilne faze: 0,2 mL min⁻¹, a volumen injektiranja 2 μL. Ionizacija elektrosprejanjem provedena je u negativnom načinu za dobivanje 100-1200 m/z u MS analizi i 50-850 m/z u MS/MS analizi. Parametri ionizacije prikazani su u Tablici 24, a dušik je korišten kao protočni plin i plin za desolvaciju. Primijenjene kolizijske energije za odabrane prekursor ione iznosile su 10, 20, and 40 V. Identifikacija analiziranih polifenolnih frakcija provedena je usporedbom rezultata eksperimentalno dobivenih prekursor i fragment iona s dostupnim literaturnim bazama podataka (Sci Finder, SAD).

Tablica 24. Parametri ionizacije MS i MS/MS analize polifenolnih frakcija ekstrakta trave ive

| Parametar analize | |
|--|------|
| temperatura (°C) | 350 |
| protok protočnog plina (L min ⁻¹) | 11 |
| tlak raspršivača (psi) | 35 |
| potencijal kapilare (V) | 3500 |
| potencijal mlaznice (V) | 3000 |
| temperatura plina za desolvaciju (°C) | 200 |
| protok plina za desolvaciju (L min ⁻¹) | 14 |

3.2.2.6. *Kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)*

Identificirani polifenolni spojevi kvantificirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) usporedbom retencijskih vremena nepoznatih spojeva s retencijskim vremenima analitičkih standarda ili u ekvivalentima dostupnih standarda. Primijenjeni kromatografski uvjeti bili su isti kao i kod analitičkog izdvajanja polifenolnih

frakcija (opisano u 3.2.2.5.2). izuzev promjene u volumenu injektiranja (5 μL umjesto 20 μL). Ehinakozid (3-180 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $R^2=0,99$) i verbaskozid (3-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $R^2=1,00$) kvantificirani su obzirom na retencijsko vrijeme analitičkih standarda pri identičnim kromatografskim uvjetima. Frakcije PH2, PH4, PH5, PH6, PH7 i PH9 identificirane su u ekvivalentima ehinakozida (mg ekv. EHI g^{-1} s. tv.), frakcija 10 u ekvivalentima verbaskozida (mg ekv. VERB g^{-1} s. tv.), a identificirani flavonoidi PH1, PH12 i PH13 u ekvivalentima diosmetina ($R^2=0,99$, 3,9-97,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mg DS g^{-1} s. tv.), akacetina ($R^2=0,99$, 3,6-90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mg AC g^{-1} s. tv.), odnosno apigenina ($R^2=0,99$, 2,4-120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mg AP g^{-1} s. tv.).

3.2.3. Priprema liofiliziranog ekstrakta za analizu bioloških učinaka

U svrhu očuvanja biološki aktivnih spojeva tijekom duljeg vremena skladištenja i mogućnosti pripreme različitog raspona radnih koncentracija, provedena je liofilizacija ekstrakta trave ive koji je imao najizraženiji bioaktivni potencijal (TI_2) za *in vitro* te *in vivo* analize. Ekstrakt je pripremljen prema optimiranim ekstrakcijskim uvjetima, koncentriran do suhog pri temperaturi vodene kupelji od 40 °C. Resuspendirani ekstrakt u minimalnoj količini vode (s početnog volumena ekstrakta od jedne litre dobiveno je otprilike 15 mL koncentriranog ekstrakta) je u potpunosti kvantitativno prenesen u Falcon epruvetu i liofiliziran.

3.2.4. In vitro analize polifenolnog ekstrakta trave ive

U svrhu određivanja prooksidacijskog/antioksidacijskog, citotoksičnog/proliferativnog te genotoksičnog/protektivnog učinka ekstrakta trave ive na odabranim kontinuiranim humanim staničnim linijama, modelu DNK i bakterijskim kulturama *in vitro*, definirane su radne koncentracije liofiliziranog ekstrakta trave ive koje se nalaze u pola (0,5x), jednoj (1x), tri (3x), pet (5x) i deset (10x) šalice vodenog napitka pripremljenog za konzumaciju na standardan način (2 g : 200 mL, prelijevanje proključalom vodom uz ekstrakciju kroz 30 minuta). Pomoću određene suhe tvari ekstrakta (0,24 %), preračunate su radne koncentracije za pripremu radnih otopina za *in vitro* analize, a što odgovara 0,025 mg mL^{-1} za 0,5x, 0,05 mg mL^{-1} za 1x, 0,15 mg mL^{-1} za 3x i 0,5 mg mL^{-1} za 10x dozu. Za određivanje prooksidacijskog i citotoksičnog djelovanja na odabranim humanim staničnim linijama, najprije je potrebno uzgojiti stanice u monosloju korištenjem kompletiranog medija uz dodatak fetalnog goveđeg seruma, pripremiti suspenzije stanica i u mikrotitarske pločice s 96 jažica nacijepiti po 100 μL suspenzije stanice početne koncentracije 10^5 mL^{-1} . Nakon postizanja subkonfluentnog stanja tijekom 24 sata kultivacije, medij se uklanja te se stanice tretiraju s radnim koncentracijama ekstrakta u trajanju

od 2 i 24 sata prethodno pripremljenog u odgovarajućem hranjivom mediju. Nakon završenog tretmana, na stanice se dodaju odgovarajući reagensi kojima će se utvrditi da li je došlo do citotoksičnog, proliferativnog, antioksidacijskog ili prooksidacijskog djelovanja.

3.2.4.1. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka na kontinuirane humane stanične linije

Za analizu citotoksičnog odnosno proliferativnog učinka ekstrakta trave ive korištena je Neutral red metoda nazvana po boji neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) koja aktivnim transportom prolazi kroz staničnu membranu žive stanice, akumulirajući se unutar lizosoma. U slučaju oštećenja ili odumiranja stanice, neće doći do vezanja boje. Nakon uklanjanja medija iz jažica prozirne mikrotitarske pločice i njihovog ispiranja, slijedi bojanje Neutral Red bojom. Nakon inkubacije u CO₂ inkubatoru (37 °C, 3 sata), iz jažica se uklanja otopina boje, a boja nakupljena u stanicama ekstrahira se otopinom za odbojavanje uz mjerenje apsorbancije pri 540 nm (Repetto i sur., 2008). Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji vijabilnih stanica, a postotak preživljenja stanica izračunava se u odnosu na negativnu kontrolu kao: postotak preživljenja (%) = $(A_{540} \text{ uzorka} / A_{540} \text{ kontrole}) \times 100$.

3.2.4.2. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka na kontinuirane humane stanične linije

Za određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (*eng.* reactive oxygen species, ROS) nakon tretmana ekstraktom korištena je metoda DCFH-DA (2',7'-diklorfluorescein diacetat) (Silveira i sur., 2003). Nakon ulaska u citoplazmu stanice difuzijskim transportom, stanične esterase hidroliziraju acetatne skupine nefluorescentne DCFH-DA boje, a pri čemu se oslobađa DCFH (2',7'-diklorfluorescein). Vezanjem DCFH na ROS-ove, dolazi do pojave fluorescencije. Nakon tretmana stanica radnim koncentracijama ekstrakta, slijedi ispiranje PBS puferom uz dodatak 100 µL DCFH-DA boje (0,05 mM u PBS-u) u jažice crne mikrotitarske pločice. Nakon tretmana (15 minuta u CO₂ inkubatoru pri 37 °C), intenzitet fluorescencije proporcionalan je udjelu ROS-ova, a mjeri se pri 485 nm (emisija) i 530 nm (ekscitacija). Indukcija slobodnih radikala izražava se u odnosu na negativnu kontrolu (100 %).

3.2.4.3. Određivanje bakteriostatskog/proliferativnog učinka na predstavnike humane mikrobiote

Prije samog tretmana ekstraktom trave ive, *S. aureus* i *E. coli* uzgojene su u LB kompletnoj hranjivoj podlozi, dok je *L. plantarum* uzgojena u MRS selektivnoj hranjivoj podlozi, do eksponencijalne faze rasta. Nacijepi se 100 μL bakterijske suspenzije u svaku jažicu mikrotitarske pločice, uz tretman ekstraktom tako da je ukupan volumen reakcijske smjese 200 μL . Nakon inkubacije (1 sat, 37 °C), naprave se mikrorazrjeđenja te se nasade na krute selektivne hranjive podloge (M9-minimalna podloga s laktozom za *E.coli* i *S. aureus* te MRS podloga za *L. plantarum* uz dodatak agara u koncentraciji od 15 g L⁻¹). Tako nacijepljene podloge uzgajane su 24 h pri 37 °C, nakon čega je izbrojan broj poraslih kolonija (eng. CFU, *colony forming unit*), a rezultati su izraženi kao postotak preživljenja bakterija u odnosu na negativnu kontrolu (porasle bakterije u hranjivom mediju kao 100% preživljenje).

3.2.4.4. Određivanje genotoksičnog/genoprotektivnog učinka na humane kontinuirane stanične linije i modelnu DNK

Genotoksični učinak ekstrakta trave ive na modelni plazmid phi174 RF1 DNA ispitan je elektroforezom u agaroznom gelu prema modificiranom protokolu Keum i sur. (2000). Modelni plazmid u superzavijenoj formi podvrgava se kombiniranom djelovanju UV zračenja i vodikovog peroksida što uzrokuje nastanak hidroksilnog radikala, odnosno razmatanje i prelazak u relaksiranu formu koja sporije putuje u gelu u odnosu na superzavijenu formu. U konačnici, dolazi do razdvajanja fragmenata DNK na temelju veličine, tj. odjeljivanja vrpce DNK unutar gela koje se mogu vizualizirati bojenjem pomoću fluorescentnih interkalirajućih boja, poput etidijevog bromida. Što je više oštećenog plazmida uslijed djelovanja hidroksilnog radikala, to je intenzivnija gornja vrpca relaksirane forme DNK. Nakon pripreme 1 %-tnog agaroznog gela u puferskoj otopini Tris baze, octene kiseline i EDTA (TAE), te formiranja jažica na gelu u kalupu za elektroforezu, nanose se pripremljene reakcijske smjese (30 μL) sastavljene od definiranih radnih koncentracija testiranog uzorka, 0,2 %-tnog (v/v) vodikovog peroksida i plazmida (0,1 mg mL⁻¹). Izlaganje svih uzoraka UV zračenju provodi se 3 minute. Uz testirane uzorke, postavi se pozitivna kontrola sastavljena od plazmida i vodikovog peroksida te se izlaže zračenju pod UV lampom. Nadalje, potrebno je pripremiti i tri negativne kontrole: i) uzorak u kojem se nalazi samo plazmid, ii) plazmid i vodikov peroksid bez izlaganja UV zračenju te iii) plazmid zračen UV svjetlom. Nakon tretmana, dodaje se 1 μL pufera za nanošenje koji sadrži bromtimol plavu i glicerol, a čime je omogućeno vizualno praćenje

elektroforeze (1 sat, 150 mA) i apsorpcija uzorka u gel. Pri završetku elektroforeze, uzorci se boje otopinom etidijevog bromida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), a vizualizacija se provodi pomoću transiluminatora. Slike gela s prikazima intenziteta vrpce superzavijene i relaksirane forme plazmida obrađene su pomoću softverskog programa GelAnalyzer 19.0., a rezultati su izraženi kao omjer površine vrpce superzavijene i relaksirane forme. Statistička obrada je provedena samo u odnosu na negativnu kontrolu (samostalni plazmid).

Genotoksični učinak na kontinuiranim humanim staničnim linijama ispitan je elektroforezom prema modificiranoj metodi Singh i sur. (1988). Cilj provedbe tzv. komet testa je osloboditi tretiranu DNK u stanici i odvojiti DNK fragmente u primijenjenom električnom polju tijekom procesa elektroforeze obzirom na njihovu veličinu. Oštećeni, manji fragment DNK, migrira brže od većih, neoštećenih fragmenata koji sadrže nukleoidno tjelešće nalik strukturi komete. "Glava" komete je intaktna, dok je oštećena tzv. „rep komete“. Najprije se uzgoje testirane stanične suspenzije CAL27, HepG2, AGS i Caco-2 pri početnoj koncentraciji od 10^5 stanica mL^{-1} , nakon 24 sata se ukloni istrošeni hranjivi medij te se stanice tretiraju s po 3 mL ekstrakta trave ive definiranih radnih koncentracija, prethodno resuspendiranog u hranjivom mediju. Nakon 2 i 24 sata tretmana, uklanja se medij, a nizom preparativnih procesa dobije se talog sa stanicama potreban za daljni tretman. Nakon nanošenja resuspendiranih stanica ($10 \mu\text{L}$) i 0,5 %-tne agaroze ($100 \mu\text{L}$) na polimerizirani sloj agaroze na brušenom predmetnom stakalcu, provodi se liza stanica u puferu preko noći na 4°C . Zatim se provede elektroforeza u alkalnom puferu (300 mA, 25 V, 20 minuta). U svrhu neutralizacije, stakalca se isperu s Tris-HCl puferom tri puta. Neposredno prije analize na epifluorescencijskom mikroskopu, staklaca se bojaju otopinom etidij bromida (10 mg mL^{-1}). Na svakom preparatu izmjereno je 50 komete, a u ovom radu korišteni su parametri intenziteta repa i dužine repa.

3.2.5. In vivo analize polifenolnog ekstrakta trave ive

3.2.5.1. Plan eksperimenta i obrada životinja

U cilju ispitivanja učinka ekstrakta trave na oksidacijski stres, kao i potencijalni genotoksični, odnosno protektivni učinak, eksperimentalne životinje podijeljene su u tri skupine po četiri štakora, ovisno o spolu, uz kontrolnu grupu mužjaka i ženki (ukupno 26 štakora). Kontrolna grupa mužjaka i ženki, umjesto ekstrakta, tretirana je destiliranom vodom. Štakori su tretirani s tri koncentracije ekstrakta trave ive (250 mg kg^{-1} , 500 mg kg^{-1} i 1000 mg kg^{-1}) oralno-gastralnom kanilom (*per os*) u vremenskom periodu od 14 dana. Životinje su na 15. dan anestezirane te žrtovane u cilju prikupljanja krvi, jetre, bubrega i slezene potrebnih za

daljnje analize. Životinje su vagane na 1. dan tretmana i na dan žrtvovanja za procjenu promjene mase štakora i organa. Uzorci krvi prikupljeni su iz abdominalne aorte sukladno referentnom protokolu (CLSI, 2007), u vacutainere prikladne za biokemijske, hematološke i spektrofotometrijske analize, dok se za komet test koristila krv direktno izuzeta iz peritonealne šupljine štakora tijekom žrtvovanja. Organi su čuvani na -80 °C do daljnjih analiza.

Postotak promjene mase štakora (%) izračunat je prema omjeru odvaganih masa na kraju (dan žrtvovanja) i na početku eksperimenta (1. dan tretmana) za svaku testiranu jedinku. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost unutar svake testirane grupe uz pripadajuću standardnu devijaciju, obzirom na kontrolu. Udjel organa jetre i bubrega izračunat je iz omjera očišćenog i odvaganog organa i mase štakora. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost unutar svake testirane grupe, uz pripadajuću standardnu devijaciju.

3.2.5.2. Analiza biokemijskih i hematoloških parametara krvi štakora

Za biokemijske analize, krv je prikupljena u vacutainer epruvete bez antikoagulansa, a svi hematološki parametri su određeni na krvnom serumu izdvojenom centrifugiranjem (5 minuta, 2500 rpm) nakon hlađenja (30 minuta, 4 °C). Za potrebe hematološke analize, krv iz aorte je prikupljena u vacutainere s antikoagulansom EDTA. Od biokemijskih parametara, određeni su: ukupni proteini, aspartat transaminaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), laktat dehidrogenaza (LDH), glukoza, ukupni bilirubin, urea i kreatinin. Od hematoloških parametara, analizirani su: broj leukocita, broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), raspodjela eritrocita po veličini (RDW), prosječan volumen trombocita (MPV) te broj trombocita.

3.2.5.3. Priprema homogenata organa za analize

Odvagano je 50-80 mg tkiva bubrega, jetre i slezene u Eppendorf epruvete (2 mL), dodan je fosfatni ili PBS pufer (pH=7,8) u omjeru 1:10 te je provedena homogenizacija ultrazvučnim homogenizatorom pomoću sonde pri snazi od 30 %, u dva sonifikacijska ciklusa od 30 s. Tijekom postupka, Eppendorf epruvete držane su na ledu u cilju sprječavanja zagrijavanja. Dobiveni homogenati su centrifugirani (15 000 rpm, 15 minuta, 4 °C, ultracentrifuga) pri čemu je supernatant otpipetiran u čiste Eppendorff epruvete, te je kao takav korišten za prikladna razrjeđenja. Dobiveni supernatanti čuvani su na -20 °C do daljnjih analiza.

3.2.5.4. Određivanje udjela proteina u homogenatima tkiva

Udjel proteina određen je prema protokolu opisanom u radu Lowry i sur. (1951). Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa i kompleksa monovalentnog bakra te proteina u lužnatim uvjetima, pri čemu nastaje reducirani, plavo obojeni kompleks. Otpipetira se 100 μL razrijeđenog (faktor razrjeđenja, R_f) supernatanta ($R_{f \text{ jetre}}=40$, $R_{f \text{ bubrega}}=20$) pripremljenog iz homogenata i 2 mL otopine D pripremljene prema Tablici 25. Nakon inkubacije (10 minuta, 25 °C), dodaje se 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđen s vodom u omjeru 2:1). Apsorbancija reakcijske smjese mjeri se nakon 30 minuta pri 600 nm, a koncentracija proteina, proporcionalna intenzitetu obojenja, izračunata je iz baždarne krivulje za albumin iz goveđeg seruma (0,2-2 mg mL⁻¹). Rezultati koji se odnose na udjel proteina u homogenatima nisu prikazani direktno u radu, obzirom da oni samo služe za preračunavanje svih dobivenih rezultata vezanih za intenzitet lipidne peroksidacije, intenzitet oštećenja proteina te aktivnost ukupnog glutaciona u homogenatima tkiva.

Tablica 25. Priprema reakcijskih otopina za određivanje proteina prema Lowry (1951)

| Otopina | Sastav |
|---------|---|
| A | 2 % (w/v) Na ₂ CO ₃ u 0,1 M NaOH |
| B | 1 % (w/v) NaK-tartarat×4 H ₂ O u destiliranoj H ₂ O |
| C | 0,5 % CuSO ₄ ×4 H ₂ O u destiliranoj H ₂ O |
| D | otopina A + otopina B + otopina C=48:1:1 |

3.2.5.5. Određivanje intenziteta oštećenja proteina u homogenatima tkiva

Za određivanje koncentracije karboniliranih proteina, kao jednog od markera oksidacijskog stresa, korišten je protokol prema radu Levine i sur. (1990). Ova kolorimetrijska metoda temelji se na derivatizaciji proteina pomoću dinitrofenilhidrazina (DNPH) koji reagira s karbonilnim skupinama proteina pritom formirajući hidrazone koji se mogu detektirati spektrofotometrijski u UV području.

Najprije se u Eppendorf epruvete (2 mL) otpipetira 200 μL nerazrijeđenog supernatanta pripremljenog iz homogenata i 300 μL 10 mM otopine DNPH pripremljene u 2 M HCl. Nakon inkubacije reakcijske smjese kroz 1 sat na sobnoj temperaturi, dodaje se 500 μL 20 %-tne otopine trikloroctene kiseline za precipitaciju derivatiziranih proteina, pri čemu se uzorci stave na -20 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja (12 000 rpm, 10 minuta, 4 °C), supernatant se odbacuje, a talog se ispiri 3×1 mL smjesom etanola i etilnog acetata (1:1, v/v). U konačnici, talog se otopi u 1 mL 6 M otopine gvanidin hidroklorida pripremljene u 2 M HCl,

kao dodatnog koraka pročišćavanja, i ostavi preko noći na 25 °C. Izdvojenom supernatantu izmjeri se apsorbanacija pri 370 nm. Koncentracija karboniliranih proteina računa se prema formuli [1]:

$$c \text{ (KP)} = \frac{A_{\text{slijepa proba(370)}} - A_{\text{uzorka(370)}}}{l \text{ (cm)} \times \epsilon \times \gamma_{\text{proteina}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad [1]$$

pri kojoj molarni ekstincijski koeficijent (ϵ) iznosi 22 mM⁻¹ cm⁻¹, a duljina kivete (l) 1 cm.

3.2.5.6. *Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u homogenatima tkiva*

Prema metodi Ohkawa i sur. (1979) provedeno je određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u uzorcima jetre i bubrega mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) koji nastaje kao nusprodukt razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina pod utjecajem generiranih slobodnih kisikovih radikala. U tu svrhu, provodi se derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA, generirajući kompleks MDA-(TBA)₂.

U Eppendorf epruvete (2 mL) otpipetira se 100 μL nerazrijeđenog supernatanta pripremljenog iz homogenata i 1,5 mL otopine pripravljene od 8,1 % SDS, 20 % octene kiseline (pH=3,5) i 0,81 % TBA. Reakcijska smjesa postavi se u vodenu kupelj pri 95 °C sat vremena. Nakon toga, uzorci su naglo ohlađeni 10 minuta na ledu i centrifugirani pri 5000 rpm, 4 °C i tijekom 10 minuta. Slijepa proba sadržavala je vodu umjesto uzorka. Apsorbancija supernatanta izmjerena je spektrofotometrijski pri 532 nm, a prilikom izračuna koncentracije ukupno produciranog MDA potrebno je uračunati ekstincijski koeficijent za MDA ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) te duljinu kivete (l) od 1 cm, prema formuli [2]:

$$c \text{ (MDA)} = \frac{A_{\text{uzorka}} \times V_{\text{reakcijske smjese}} \text{ (mL)}}{l \text{ (cm)} \times \epsilon \times V_{\text{uzorka}} \text{ (mL)} \times \gamma_{\text{proteina}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad [2]$$

3.2.5.7. *Određivanje koncentracije ukupnog glutationa u homogenatima tkiva*

Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva jetre i bubrega određena je prema metodi iz rada Tietze (1969). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) s maksimumom apsorpcije pri 412 nm i oksidirani oblik GS - TNB čijom se redukcijom pomoću glutation reduktaze (GR) i NADPH otpušta molekula TNB i reciklira GSH. Konačan dobiveni rezultat odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Najprije se pripreme potrebne otopine za reakcijsku smjesu: 50 mM fosfatni pufer (PBS) za pripremu razrijeđenja, 0,5 M pufer PBS s dodanom 0,5 M EDTA, 0,035 M HCl, Ellmanov reagens-10 mM DTNB, 0,8 mM NADPH u prethodno pripremljenom PBS puferu s EDTA te glutation reduktaza (20 μL , 50 U mL^{-1}) otopljena u 0,8 mM NADPH otopini (9980 μL). Zatim se u svaku jažicu prozirne mikrotitarske pločice otpipetira 20 μL razrijeđenog homogenata ($Rf_{\text{jetre}}=40$, $Rf_{\text{bubrega}}=20$), 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB-a. Izmjeri se apsorbancija pri 415 nm. Odmah nakon mjerenja, u svaku jažicu se doda 100 μL prethodno pripremljene otopine glutation reduktaze i NADPH te se apsorbancija reakcijske smjese s dodatkom enzima mjeri tijekom 5 minuta u intervalima od jedne minute (ukupno 5 mjerenja). Prije početka mjerenja, homogeniziranje reakcijske smjese podešeno je na 5 s unutar spektrofotometra. Za izračun se uzima srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija nakon dodatka enzima, a koja se oduzima od izmjerene apsorbancije bez enzima. Tako dobivena promjena apsorbancije koristi se u formuli za izračun koncentracije ukupnog GSH [3] izraženog u mU mg^{-1} proteina, pri čemu je i uračunat ekstinkcijski koeficijent za DTNB ($8,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{\text{uzorka}} \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\epsilon \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \times \gamma_{\text{proteina}} (\text{mg mL}^{-1})} \quad [3]$$

3.2.5.8. Određivanje učinka na parametre genotoksičnosti komet testom

Za analizu učinka ekstrakta trave ive na genetički materijal krvnih stanica te stanica bubrega i jetre, korištena je standardna metoda komet testa (Singh i sur., 1988). Najprije se pripreme brušena predmetna stakalca sa priređenim slojem agaroze normalnog tališta (1 %-tna agarozu-uklanjanje sloja-0,6 %-tna agarozu). Nakon 10 minuta, na taj sloj nanese se 100 μL 0,5 % agaroze niskog tališta s 5 μL krvi izuzete iz intraperitonealne šupljine za krv, odnosno iz suspenzije tkiva jetre i bubrega, te pokrije pokrovnicom. Nakon držanja preparata na ledu (10 minuta), skida se pokrovnica te se preparati urone u pufer (pH=10) za liziranje stanica (2,5 M NaCl, 1 %-tni Na-laurilsarkozinat, 100 Mm Na_2EDTA , 10 Mm Tris-HCl, 10 %-tni DMSO i 1 %-tni Triton X-100) kroz 1 sat pri 4 °C. Zatim se preparati prebacuju u pufer za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA , pH=13). Nakon 20 minuta, preparati se postavljaju u kadnicu za elektroforezu prethodno ispunjenom s puferom za denaturaciju (400 mA, 25 V, 20 minuta). Nakon elektroforeze, preparati se ispiru po tri puta svakih 5 minuta u neutralizacijskom puferu (0,4 M Tris-HCl, pH=7,5), pri čemu slijedi fiksiranje s etanolom i sušenje. Prije analize, preparati se boje interkalirajućim sredstvom (otopina etidijevog bromida, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a nakon

stajanja, na svakom preparatu (analiza 100 kometa po preparatu) izmjeri se dužina repa i intenzitet repa na epifluorescencijskom mikroskopu.

3.2.6. Inkapsulacija ekstrakta sušenjem raspršivanjem

3.2.6.1. Priprema otopina nosača

U svrhu valorizacije ekstrakta trave ive primjenom inkapsulacijske tehnike sušenja raspršivanjem, najprije je vodeni ekstrakt najizraženijeg bioaktivnog potencijala uparen do jedne desetine početnog volumena. Zatim su u koncentriranom ekstraktu pripremljene 4 %-tne otopine (w/w) arapske gume (AG) i djelomično hidrolizirane guar gume (GG), te 0,8 %-tna otopina karboksimetil celuloze (KMC). Paralelno su pripremljene i binarne otopine, kako je i prikazano u Tablici 26, pri čemu je udjel dodanih polimera u svakoj kombinaciji iznosio 25 % na ukupnu masu polimera. Sve otopine su homogenizirane na magnetnoj mješalici pri sobnoj temperaturi između 2-12 sati, ovisno o kombinaciji polimera.

Tablica 26. Popis svih kombinacija za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem

| Oznaka | Formulacije na bazi arapske gume |
|--|---|
| AG_ | arapska guma (4 %) |
| AG_KOL | arapska guma (3 %) + hidrolizirani kolagen (1 %) |
| AG_KAR | arapska guma (3 %) + κ -karagenan (1 %) |
| AG_KMC | arapska guma (3 %) + karboksimetil celuloza (1 %) |
| Formulacije na bazi djelomično hidrolizirane guar gume | |
| GG | guar guma (4 %) |
| GG_KOL | guar guma (3 %) + hidrolizirani kolagen (1 %) |
| GG_KAR | guar guma (3 %) + κ -karagenan (1 %) |
| GG_KMC | guar guma (3 %) + karboksimetil celuloza (1 %) |
| Formulacije na bazi karboksimetil celuloze | |
| KMC | karboksimetil celuloza (0,8 %) |
| KMC_AG | karboksimetil celuloza (0,6 %) + arapska guma (0,2 %) |
| KMC_GG | karboksimetil celuloza (0,6 %) + djelomično hidrolizirana guar guma (0,2 %) |
| KMC_KOL | karboksimetil celuloza (0,6 %) + hidrolizirani kolagen (0,2 %) |
| KMC_KAR | karboksimetil celuloza (0,6 %) + κ -karagenan (0,2 %) |

3.2.6.2. Reološka karakterizacija otopina nosača

Krivulje viskoznosti i reološki testovi (test amplitude i frekvencije) otopina nosača u ekstraktu provedena su korištenjem modularnog kompaktnog reometra opremljenog s Peltier sustavom za preciznu kontrolu temperature ispitivanog sustava i pripadajućim mjernim tijelima.

Za sve grafičke prikaze, vrijednosti su prikazane na logaritamskoj skali radi bolje vizualizacije širokog raspona dobivenih vrijednosti, osobito u rasponu niskih brzina smicanja.

3.2.6.2.1. *Određivanje krivulje viskoznosti*

Ovisnost viskoznosti (η) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$) određena je rotacijskim testom. Korišteno je mjerno tijelo CP50-1 (eng. *cone plate*) promjera 50 mm, nagiba 1° s definiranom, fiksnom udaljenošću od donje ploče (0,102 mm). Test je proveden u rasponu brzina smicanja ($\dot{\gamma}$) od 0,1-100 s^{-1} ili u 0,1-1000 s^{-1} (ovisno o setu polimernih otopina) pri 25 $^\circ C$.

3.2.6.2.2. *Test promjene amplitude*

Za definiranje linearnog viskoelastičnog područja (eng. *linear viscoelastic range*, LVE) te modula pohrane (G') i modula gubitka (G''), proveden je oscilacijski test-test amplitude s konstantnom kutnom frekvencijom tijekom mjerenja (eng. *shear-stress-amplitude sweep, with controlled shear stress*). Korišteno je mjerno tijelo PP50 (eng. *parallel plate*, promjer: 50 mm) s fiksnom udaljenošću od donje ploče postavljene na 0,500 mm te definiranom kutnom frekvencijom ($\omega=6,28 \text{ rad s}^{-1}$). Mjerenja su provedena pri 25 $^\circ C$ u rasponu smične deformacije (γ) od 0,1 do 100 %.

3.2.6.3. *Provedba inkapsulacije sušenjem raspršivanjem*

Korišten je sušionik raspršivanjem s pripadajućom opremom. Za sve uzorke korišten je promjer mlaznice od 150 μm , osim kod AG_KMC i GG_KMC (600 μm). Prema prethodno provedenoj optimizaciji, definirani su radni uvjeti procesa. Za AG, AG_KOL, AG_KAR, GG, GG_KOL, GG_KAR, AG_KMC, GG_KMC polimerne sustave uspostavljeni su sljedeći parametri: protok otopine nosača-2,4 $mL \text{ min}^{-1}$, ulazna temperature-150 $^\circ C$, protok medija za raspršenje (atomizaciju)-831 $L \text{ h}^{-1}$ i aspiracija-100 %. Za uzorke KMC, KMC_GG, KMC_AG, KMC_KOL i KMC_KAR proces je proveden identičnim, prethodno navedenim radnim uvjetima, samo pri manjem protoku (1,2 $mL \text{ min}^{-1}$). Izlazna temperatura procesa iznosila je 90 $^\circ C \pm 5$.

3.2.6.4. Karakterizacija prahova

3.2.6.4.1. Određivanje prinosa

Prinos tehnike (%) određen je gravimetrijski iz omjera mase praha nakon procesa sušenja raspršivanjem (m_p) i ukupne suhe tvari u otopini nosača (m_{stv_po}), prema formuli [4]:

$$PP (\%) = \frac{m_p}{m_{stv_po}} \times 100 \quad [4]$$

3.2.6.4.2. Određivanje suhe tvari

Suha tvar dobivenih prahova određena je gravimetrijski standardnom AOAC metodom sušenja pri 105 °C do konstantne mase (Padmore, 1990a).

3.2.6.4.3. Određivanje zeta potencijala, indeksa polidisperzije i veličine čestica

Zeta potencijal analiziranih prahova određen je pomoću uređaja metodom dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (eng. *MADLS*). Za mjerenje veličine čestica, svi uzorci (1 mg mL^{-1}) su razrijeđeni 100 puta u metanolu prije analize, tretirani 30 s pri 25 °C u ultrazvučnoj kupelji za razbijanje aglomerata. Analiza zeta potencijala i indeksa polidisperzije provedena je na nerazrijeđenim uzorcima.

3.2.6.4.4. Određivanje kontaktnog kuta

Određivanje kontaktnog kuta (Θ °) provedeno je pomoću optičke metode sesilne kapi (eng. *sessile-drop goniometry*) korištenjem goniometra. Prahovi (0,4-0,5 g) su prešani u kompaktne diskove kako bi se dobila glatka i uniformna površina. Kao tekućina korištena je destilirana voda, a volumen kapi tekućine bio je 2 μL . Kontaktni kut kojeg zatvara tangenta povučena iz trojne točke kontakta krute, tekuće i plinovite faze uz rub kapi kapljevine (u ovom slučaju vode) koja se nalazi na ispitivanoj površini mjeren je odmah nakon pada kapi tekućine na površinu uzorka (instrumentalno mjereno nakon 60-80 ms).

3.2.6.4.5. Morfološka karakterizacija primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM)

Morfologija analiziranih prahova određena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (eng. *SEM*). Rezultati (SEM mikrografije) dobiveni su pri naponu od 3,8 kV i povećanju $\times 2000$.

3.2.6.4.6. Određivanje funkcionalnih skupina ATR-FT-IR tehnikom

Interakcije između funkcionalnih skupina čistih polimera i polifenolnih spojeva analizirane su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom i prigušenom totalnom refleksijom (eng. *attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy*, ATR-FT-IR) korištenjem spektrometra. Ukupno 32 kumulativna skeniranja snimljena su u prigušenoj potpunoj refleksiji u frekvencijskom rasponu od 400-4000 cm^{-1} , s rezolucijom od 0,16 cm^{-1} kako bi se dobili spektri apsorpcije funkcionalnih skupina ispitivanih uzoraka.

3.2.6.4.7. Određivanje toplinskih svojstava primjenom razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC)

Toplinski fazni prijelazi korištenih nosača i inkapsulata određeni su razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC). Nakon odvage uzorka (2-3 mg) i hermetičkog zatvaranja u aluminijsku posudicu, slijedi analiza u inertnoj atmosferi (protok dušika=50 mL min^{-1}) prema temperaturnom ciklusu (od -70 do 250 $^{\circ}\text{C}$) sastavljenom od tri segmenta: i) hlađenje od 25 $^{\circ}\text{C}$ do -70 $^{\circ}\text{C}$ pri brzini zagrijavanja od -30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, ii) izotermalni ciklus od -70 $^{\circ}\text{C}$ kroz 3 minuta i iii) zagrijavanje od -70 $^{\circ}\text{C}$ do 250 $^{\circ}\text{C}$ pri brzini zagrijavanja od 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

3.2.6.4.8. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

Najprije se pripreme razrjeđenja iz incijalnih polimernih otopina i dobivenih mikročestica u vodi, prikladna za spektrofotometrijsku (TPC) i HPLC-DAD analizu. Odvažuje se 0,1 g otopine nosača u Falcon epruvetu i otpipetira 2 mL vode, odnosno 0,02 g formuliranog praha uz dodatak 3 mL vode, uz naknadnu homogenizaciju do potpunog otapanja.

Inkapsulacijska učinkovitost (IU, %), kao konačan omjer koncentracije polifenolnih spojeva prilikom ulaska u proces i koncentracije polifenolnih spojeva u finalnom proizvodu, računata je prema sljedećoj formuli [5]:

$$\text{IU (\%)} = \frac{W_i}{W_u} \times 100 \quad [5]$$

pri čemu je W_i udjel polifenolnih spojeva na suhu tvar dobivenog praha, dok je W_u udjel polifenolnih spojeva na suhu tvar polimerne otopine. Za potrebe izračuna inkapsulacijske učinkovitosti, određena je i suha tvar otopina nosača u ekstraktu prema AOAC standardnoj metodi (Padmore, 1990a).

3.2.6.4.9. Kinetika otpuštanja polifenola u in vitro uvjetima

In vitro digestija formuliranih mikročestica provedena je prema metodi INFOGEST 2.0. (Brodkorb i sur., 2019). Odvagani uzorci (0,2 g) najprije su izloženi simuliranoj želučanoj fazi pri pH=3 (eng. *simulated gastric fluid*, SGF) miješanjem s 35 mL prethodno pripremljenog SGF fluida (enzimska aktivnost u 35 mL-2000 U mL⁻¹) prema protokolu. Nakon 120 minuta, simulirani himus pomiješa se u omjeru 1:1 s prethodno pripremljenim simuliranim intestinalnim fluidom (eng. *simulated intestinal fluid*, SIF) u kojem su otopljeni pankreatin (1 mg mL⁻¹ na konačan volumen) i žučne soli (2,5 mg mL⁻¹ na konačan volumen). U simuliranoj intestinalnoj fazi, kinetika praćenja provedena je kroz 60 minuta uz konstantno miješanje (110 rpm). Temperatura je održavana pri 37 °C pomoću temperaturne sonde. Uzorkovanje (700 µL) analiziranih prahova, kao i slijepe probe (SGF, odnosno SGF+SIF bez uzorka), provedeno je u vremenskom intervalu 5-180 minuta, a kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva praćena je TPC metodom (Singleton i Rossi, 1965). Rezultati su izraženi u mg ekv. EHI g⁻¹ praha.

3.2.7. Inkapsulacija ekstrakta elektroispredanjem

3.2.7.1. Priprema otopina nosača

Za pripremu polimernih otopina korišten je pululan u kombinaciji s hidroliziranim kolagenom, te proteinima biljnog podrijetla-zeinom i izolatom proteina konoplje. Za binarne otopine pululana i hidroliziranog kolagena, odvagane su mase pojedinog polimernog nosača prema definiranim omjerima u Tablici 27, te su otopljene u prethodno koncentriranom vodenom ekstraktu s ukupnim udjelom nosača od 12 %, w/w. Identičan pristup primijenjen je i za polimerne otopine na bazi pululana i zeina (15 %, w/w), te pululana i izolata proteina konoplje (10 %, w/w), s tim da je korišten prethodno koncentrirani vodeni ekstrakt do jedne dvadesetine početnog volumena, dodatno razrijeđen ledenom octenom kiselinom u omjeru 1:1. Za stabilizaciju polimernih sustava na bazi pululana i proteina biljnog podrijetla korišten je suncokretov lecitin (3 % w/w na ukupnu masu otopine).

Tablica 27. Eksperimentalni plan za elektroispredanje ekstrakta trave ive u različitim polimernim nosačima

| Polimerni nosač 1 | Polimerni nosač 2 | Udjel polimernog nosača 1 (%) | Udjel polimernog nosača 2 (%) | Ukupni udjel nosača u otopini (%) | Udjel lecitina (%) | Oznaka uzorka | Vizualna uspješnost procesa |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------|-----------------------------|
| pululan | / | 100 | / | | / | 12PUL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 80 | 20 | | / | 80PUL:20KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 70 | 30 | | / | 70PUL:30KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 60 | 40 | | / | 60PUL:40KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 50 | 50 | 12 | / | 50PUL:50KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 40 | 60 | | / | 40PUL:60KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 30 | 70 | | / | 30PUL:70KOL | + |
| pululan | hidrolizirani kolagen | 20 | 80 | | / | 20PUL:80KOL | + |
| / | hidrolizirani kolagen | / | 100 | | / | 12KOL | - |
| pululan | / | 100 | / | | / | 15PUL | + |
| pululan | / | 100 | / | | 3 | 15PUL+lec | - |
| pululan | zein | 80 | 20 | | 3 | 80PUL:20ZE | + |
| pululan | zein | 70 | 30 | | 3 | 70PUL:30ZE | + |
| pululan | zein | 60 | 40 | | 3 | 60PUL:40ZE | + |
| pululan | zein | 50 | 50 | 15 | 3 | 50PUL:50ZE | + |
| pululan | zein | 40 | 60 | | 3 | 40PUL:60ZE | + |
| pululan | zein | 30 | 70 | | 3 | 30PUL:70ZE | + |
| pululan | zein | 20 | 80 | | 3 | 20PUL:80ZE | + |
| / | zein | / | 100 | | / | 15ZE | - |
| / | zein | / | 100 | | 3 | 15ZE+lec | - |
| pululan | / | 100 | / | | / | 10PUL | - |
| pululan | / | 100 | / | | 3 | 10PUL+lec | + |
| pululan | proteini konoplje | 80 | 20 | | 3 | 80PUL:20PK | + |
| pululan | proteini konoplje | 70 | 30 | | 3 | 70PUL:30PK | + |
| pululan | proteini konoplje | 60 | 40 | 10 | 3 | 60PUL:40PK | + |
| pululan | proteini konoplje | 50 | 50 | | 3 | 50PUL:50PK | + |
| pululan | proteini konoplje | 40 | 60 | | 3 | 40PUL:60PK | + |
| pululan | proteini konoplje | 30 | 70 | | 3 | 30PUL:70PK | + |

3.2.7.2. Reološka karakterizacija otopina nosača

- Reološka mjerenja obuhvaćala su rotacijski test za definiranje krivulja viskoznosti te oscilacijske testove (test promjene amplitude i test promjene frekvencije). Mjerenja su provedena korištenjem modularnog kompaktnog reometra opremljenog s Peltier sustavom za preciznu kontrolu temperature ispitivanog sustava. Za sve grafičke prikaze, vrijednosti su prikazane na logaritamskoj skali.

3.2.7.2.1. Određivanje krivulje viskoznosti

Primijenjena metodologija opisana je u potpoglavlju 3.2.6.2.1., korištenjem intervala ispitivanih brzina smicanja između 1-100 s⁻¹.

3.2.7.2.2. Test promjene amplitude

Primijenjeni su isti radni uvjeti prethodno opisani u potpoglavlju 3.2.6.2.2.

3.2.7.2.3. Test promjene frekvencije

Test promjene frekvencije (eng. *frequency sweep test*) proveden je za samo za ne-Newtonovske sustave, u rangu kutne frekvencije (ω) od 0,1-100 rad s⁻¹ pri vrijednosti smične deformacije od 0,5 % prethodno očitane iz definiranog LVE područja. Korišteno je mjerno tijelo PP50 (eng. *parallel plate*, promjer: 50 mm) s fiksnom udaljenošću od donje ploče postavljene na 0,500 mm, a sva mjerenja su provedena pri 25 °C.

3.2.7.3. Fizikalna karakterizacija otopina nosača

Fizikalne metode karakterizacije otopina nosača za elektroispredanje uključivale su određivanje konduktivnosti, površinske napetosti, gustoće te izračun bezdimenzijskog Ohnesorge-ovog broja. Dodatno, iz krivulja viskoznosti su očitane vrijednosti apsolutne/prividne viskoznosti.

3.2.7.3.1. Određivanje konduktivnosti i površinske napetosti

Električna konduktivnost otopina nosača izmjerena je pri 25 °C pomoću konduktometra, uz konstantno miješanje.

Površinska napetost analizirana je tenziometrom K100 (KRÜSS, Njemačka) uz korištenje standardne Du Noüy metode (metoda mjerenja prstenom). Uzorci su najprije

temperirani pri 25 °C. Prilikom čišćenja prstena između mjerenja polimernih sustava pululana i zeina te pululana i proteina konoplje, prije standardnog namakanja prstena u krom sumpornoj kiselini bilo je potrebno najprije namočiti prsten u 50%-tnu octenu kiselinu (v/v) u svrhu lakšeg uklanjanja zeina i proteina konoplje kao relativno hidrofobnih proteinskih nosača odnosno osiguranja adekvatnog čišćenja prstena za reproducibilna mjerenja. Kalibracija prije mjerenja pojedinog sustava polimernih nosača provedena je pomoću mili-Q-vode pri istoj 25 °C.

3.2.7.3.2. Određivanje gustoće

Digitalni denzitometar DMA 1001 korišten je za mjerenje gustoće otopina nosača pri 25 °C. Uzorak je injektiran pomoću plastične šprice u mjernu cijev uređaja, a cjelokupni process i provjera pravilnog ispuna (bez prisutnosti mjehurića) vizualiziran je pomoću digitalne kamere.

3.2.7.3.3. Određivanje Ohnesorge-ovog broja

Prethodno dobiveni rezultati gustoće (ρ , kg m⁻³), prividne viskoznosti (μ , Pa), površinske napetosti (σ , N m⁻¹), te dijametar igle korištene za elektroispredanje (L , m), potrebni su za izračun bezdimenzijskog *Ohnesorge-ovog* broja prema formuli [6]:

$$Oh = \frac{\mu}{\sqrt{\rho\sigma L}} \quad [6]$$

3.2.7.4. Provedba inkapsulacije elektroispredanjem

U cilju proizvodnje nanovlakana, pripremljene su kombinacije tri binarna sustava polimera u različitim omjerima (potpoglavlje 3.2.7.1.). Korišten je uređaj za elektroispredanje s uzemljenim, izoliranim kućištem, pripadajućom peristaltičkom pumpom, metalnom glavom za iglu i pripadajućim stalkom te pločastim kolektorom. Dovod otopine od pumpe do igle osiguran je plastičnom cjevčicom. Eksperimentalni uvjeti procesa definirani su prema Tablici 28. Za sve eksperimente korištena je igla promjera 6 mm (22 G). Ambijentalni uvjeti relativne vlažnosti i temperature održavani su između 30-38 %, odnosno 25-28 °C.

Tablica 28. Procesni parametri elektroispredanja polimernih otopina

| Polimerni sustavi | Protok otopine (mL h ⁻¹) | Napon (kV) | d igla - kolektor (cm) |
|-------------------|---|------------|------------------------|
| PUL:KOL | 1,0 | 20-22 | 11-13 |
| PUL:ZEIN | 0,8 | 20-23 | 14-15 |
| PUL:PK | 0,8 | 20-24 | 14-15 |

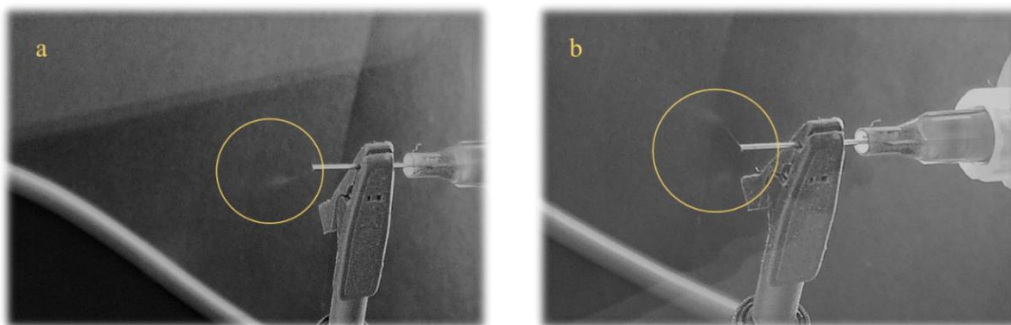
d igla - kolektor = udaljenost između igle i kolektora (cm)

U svim slučajevima relativno uspješnog formiranja Taylorovog konusa i elongiranog mlaza u prisustvu električnog napona, uzorci su sakupljeni na pločastom kolektoru obloženom aluminijskom folijom, uklonjenom nakon završetka procesa, te su kao takvi čuvani u eksikatoru na sobnoj temperaturi do daljnjih analiza.

Na Slici 19 su priloženi primjeri dobivenih proizvoda elektroispredanja, dok je na Slici 20 prikazan uspješan i neuspješan primjer formiranja Taylorovog konusa.



Slika 19. Vizualni izgled uspješno proizvedenih nanovlakana: a) 50PUL:50ZE i b) 80PUL:20KOL te c) neuspješan proizvod 100 ZE dobiven uslijed prelaska elektroispredanja u elektrosprejanje.



Slika 20. Vizualizacija procesa elektroispredanja pri: a) formiranju Taylorovog konusa i stabilnog, elongiranog mlaza polimerne otopine, b) formiranju Taylorovog konusa i naknadne destabilizacije mlaza u dva ili više smjerova kao posljedice neodgovarajućih procesnih uvjeta i reoloških svojstava polimerne otopine.

3.2.7.5. Karakterizacija nanovlakana

3.2.7.5.1. Određivanje zeta potencijala

Odvagan je 1 mg uzorka nanovlakna u Eppendorf epruvetu (2 mL) i dodan 1 mL 80 %-tnog metanola (v/v) za sve uzorke PUL:KOL, te 10 %-tne ledene octene kiseline (v/v) za set uzoraka PUL:ZE i PUL:PK. Uzorci pululana otopljeni su u 80 %-tnom metanolu (v/v). Uzorci

su zatim stavljeni u ultrazvučnu kupelj tijekom 15 minuta pri 30 °C, a dobivene suspenzije su kao takve analizirane na Zetasizer uređaju.

3.2.7.5.2. Morfološka karakterizacija primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM)

Za vizualizaciju uspješnosti elektroispredanja primijenjena je ista metodologija kao i u 3.2.6.7.6., osim što su rezultati pretražne elektronske mikroskopije (SEM mikrografije) prikazani u povećanjima od 2000-20000 ×.

3.2.7.5.3. Određivanje relativne distribucije promjera nanovlakana

Relativna distribucija promjera nanovlakana određena je analizom dobivenih SEM mikrografija pomoću ImageJ softvera za obradu slika (razvijen od strane Nacionalnog Instituta za zdravlje i Laboratorija za optičku i računsku instrumentaciju Sveučilišta u Wisconsinu, SAD). Prema skali na svakoj SEM mikrografiji (dubina boje/bita na slici=16), postavljeni su mjerni parametri za obradu slike. Dijametar je određen za 60 nanovlakana po uzorku.

3.2.7.5.4. Određivanje funkcionalnih skupina ATR-FT-IR tehnikom

Spektroskopska analiza provedena je istom metodologijom prethodno opisanom u potpoglavlju 3.2.6.4.6.

3.2.7.5.5. Određivanje promjena sekundarne konformacije proteina cirkularnim dikroizmom

Spektri cirkularnog dikroizma snimani su na spektropolarimetru u struji dušika korištenjem fluorimetrijske/CD kvarcne kivete s duljinom optičkog puta od 0,1 mm. Uzorci nanovlakana PUL:KOL otopljeni su u vodi (1 mg mL⁻¹). Obzirom da octena kiselina snažno asorbira u ispitivanom UV području (ispitivana je prikladnost koncentracija i do 0,5 M ledene octene kiseline), 10 M *orto*-fosforna kiselina (85 %, v/v) pokazala se prikladnom za otapanjem svih uzoraka PUL:ZE i PUL:PK (1 mg mL⁻¹) pri temperaturi od 40 °C uz vorteksiranje (5-15 minuta ovisno o uzorku). Radni parametri postavljeni su kako slijedi: UV dio spektra-190-280 nm, rezolucija-0,2 nm, brzina skeniranja spektra-200 nm min⁻¹, propusnost rešetke-2 nm, 1 s, broj snimljenih spektara-3. Od svakog spektra ručno je oduzeta prethodno snimljena bazna linija koju je činila destilirana voda, odnosno 10 M *orto*-fosforna kiselina.

3.2.7.5.6. Određivanje toplinskih svojstava primjenom razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC)

Određivanje faznih prijelaza polimera i nanovlakana sa i bez ekstrakta, kao i obrada dobivenih termograma, provedeni su primjenom iste metodologije kao u potpoglavlju 3.2.6.4.7. Analiza svakog uzorka (2-3 mg) provedena je u jednom ciklusu zagrijavanja od 0-280 °C.

3.2.7.5.7. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

Najprije se pripreme razrjeđenja korištenih otopina nosača u ekstraktu i dobivenih inkapsulata u vodi za set uzoraka PUL:KOL, te u 50 %-tnoj octenoj kiselini za set uzoraka PUL:ZE i PUL:PK, prikladna za HPLC-DAD i spektrofotometrijsku analizu. Odvaže se 0,2 g otopine nosača u ekstraktu za elektroispredanje u Falcon epruvetu i otpipetira 2 mL vode, odnosno 50 %-tne octene kiseline. Za uzroke nanovlakana, odvaže se 0,02-0,06 g i otpipetira 2 mL vode, odnosno 50 %-tne octene kiseline. Tako pripremljeni sustavi se miješaju na magnetnoj mješalici do potpunog otapanja.

Za potrebe određivanja IU na HPLC-u i TPC metodom, najprije su svi uzorci polimernih otopina (1 mL) i otopljenih nanovlakna (1 mL) otpipetirani u Eppendorf epruvete (2 mL) i precipitirani s 96 %-tnim etanolom u omjeru 1:1. Nakon centrifugiranja (7000 rpm, 15 minuta), dio supernatanta korišten je za TPC analizu, a dio uzorka je profiltriran (H-PTFE Chromafil filteri, 0,20 µm, Njemačka) u vijalice za HPLC analizu. HPLC analiza provedena je prema kromatografskim uvjetima opisanim u potpoglavlju 3.2.2.6., a inkapsulacijska učinkovitost je izračunata iz formule [5] opisane u potpoglavlju 3.2.6.4.8. Za potrebe izračuna, također je određena suha tvar otopina nosača u ekstraktu prema standardnoj AOAC metodi (Padmore, 1990a).

3.2.7.5.8. Kinetika otpuštanja polifenola u in vitro uvjetima

In vitro probava provedena je metodologijom prethodno opisanom u potpoglavlju 3.2.6.4.9. Rezultati su također izraženi u mg ekv. EHI g⁻¹ nanovlakna.

3.2.8. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda

3.2.8.1. Razvoj formulacija uz dodatak inkapsuliranog ekstrakta trave ive

Funkcionalni obogaćeni žele punjeni bombonski proizvodi formulirani su sa sastojcima biljnog podrijetla, uz supstituciju želatine komercijalnim kukuruznim škrobom i kudzu škrobom, te uz dodatak inkapsuliranog ekstrakta trave ive u punjenje na bazi čokoladne mase, shea maslaca i kokosovog ulja. U svrhu obogaćivanja bombona izvorom polifenolnih spojeva, odabran je KMC_KAR inkapsulat dobiven sušenjem raspršivanjem obzirom na prikladna fizikalno-kemijska svojstva. U cilju modifikacije senzorskih svojstava, razvijeno je pet formulacija u kojima se varirao udjel dvije vrste škroba (Tablica 29).

Tablica 29. Formulacije receptura žele punjenih bombonskih proizvoda

| Sastojak (%) | 100KŠ | 75KŠ_25KZ | 50KŠ_50KZ | 25KŠ_75KZ | 100KZ |
|----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|
| saharoza | 58 | 58 | 58 | 58 | 58 |
| glukozni sirup | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| kukuruzni škrob | 19 | 14 | 9,5 | 5 | / |
| kudzu škrob | / | 5 | 9,5 | 14 | 19 |
| limunska kiselina | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| aroma maline | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| prirodna boja crvena | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| liofilizirane maline | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| glicerol | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |

Bombonski proizvodi pripremljeni su u laboratorijskim uvjetima prema razvijenim recepturama. Najprije je pripremljen šećerni sirup ukuhavanjem saharoze i glukoznog sirupa (DE=42) (3:1, w/w) u destiliranoj vodi do 125 °C. Tijekom ukuhavanja, temperatura je precizno ($\pm 0,5$ °C) kontrolirana digitalnim termometrom. Pri završetku ukuhavanja, šećerno-sirupna otopina u obrocima je dodavana u prethodno želatiniziranu vodenu suspenziju kukuruznog i kudzu škroba ili njihove kombinacije, uz konstantno miješanje silikonskom špatulom. U slučaju receptura na bazi oba škroba, svaki škrob je želatiniziran zasebno, nakon čega su škrobne suspenzije združene i homogenizirane. Smjesa škroba i šećernog sirupa zagrijavana je na srednje jakoj vatri, a kraj ukuhavanja smjese određen je vizualnom procjenom, odnosno uočavanjem karakterističnog razvlačenja bombonske smjese. Gotova bombonska smjesa

ohlađena je nekoliko minuta, nakon čega je dodana prethodno pripremljena smjesa limunske kiseline, arome maline i crvene boje, usitnjenog i prosijanog praha liofiliziranih malina te glicerola, u nekoliko kapi vode. Nakon potpune homogenizacije svih inkorporiranih sastojaka, formiran je bombonski plašt na škrobnoj prozirnoj foliji za svaku recepturu.

Za pripremu punjenja, u prethodno pripremljenu smjesu ulja (1:4=shea maslac:kokosovo ulje) dodano je 2,2 % inkapsulata (preračunato na ukupnu masu punjenja od ~30 % u odnosu na masu cijelog proizvoda). Nakon homogenizacije, dodana je prethodno otopljena čokoladna masa. Omjer smjese ulja i čokoladne mase u ukupnoj smjesi u konačnici je iznosio 20 % : 80 %.

U konačnici, na bombonski plašt nanoseno je čokoladno punjenje s inkapsuliranim ekstraktom, uz formiranje oblika rolade. Dodatno, za senzorsku analizu i bioaktivnu karakterizaciju su pripremljeni žele bombonski proizvodi bez inkapsuliranog ekstrakta prema identičnim recepturama.

3.2.8.2. Određivanje udjela amiloze i amilopektina u škrobovima

Za spektrofotometrijsko određivanje amiloze i amilopektina u korištenim škrobovima za formuliranje funkcionalnih bombonskih proizvoda korišten je komercijalni enzimski set (Amylose/Amylopectin Assay Kit, Megazyme Ireland International, Ltd., Bray, Ireland).

3.2.8.3. Karakterizacija funkcionalnih bombonskih proizvoda

3.2.8.3.1. Određivanje suhe tvari

U svrhu određivanja suhe tvari žele proizvoda, korištena je standardna AOAC metoda (Padmore, 1990a).

3.2.8.3.2. Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida i metilksantina

Odvagani bombonski proizvod najprije je odmašćen heksanom (2×5 mL). U odmašćeni i suhi talog dodan je 70 %-tni metanol u dva uzastopna koraka te je provedena ekstrakcija bioaktivnih spojeva kombinacijom ultrazvučne ekstrakcije (45 minuta, pri 40 °C) i ekstrakcije pri sobnoj temperaturi (45 minuta) uz konstantno miješanje. Kvantifikacija udjela ehinakozida, teupoliozida, poliumozida, stahizozida A i verbaskozida, kao i teobromina i kafeina (podrijetlom iz korištene čokoladne mase u bombonskom punjenju) provedena je na izdvojenom supernatantu istom metodologijom kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.2.6.

3.2.8.3.3. Određivanje teksturalnih svojstava

Teksturalna analiza formuliranih bombonskih proizvoda provedena je na uređaju za mjerenje teksture. Za test penetracije (TPA), uz korištenu mjernu ćeliju od 5000 g, podešeni su parametri za: dolaznu brzinu (1 mm s^{-1}), brzinu kompresije (5 mm s^{-1}), brzinu povrata nakon kompresije (5 mm s^{-1}), dubinu kompresije (1 mm), broj ciklusa kompresije (2) i vremenski razmak između dva ciklusa kompresije (5 s). Analiza je provedena pri sobnoj temperaturi.

3.2.8.3.4. Kinetika otpuštanja polifenola u *in vitro* uvjetima

Kinetika otpuštanja polifenolih spojeva iz odabranog bombonskog matriksa praćena je određivanjem udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina (HC) (Matkowski i sur., 2008). Izdvojeni uzorci tijekom određenih vremenskih intervala najprije su centrifugirani, a supernatant je korišten za analize. Otpipetirano je 250 μL nerazrijeđenog uzorka, 500 μL 0,5 M klorovodične kiseline, 500 μL Arnov-og reagensa, 500 μL 8,5 %-tne vodene otopine natrijevog hidroksida (*v/v*) i 750 μL destilirane vode u staklenu epruvetu. Apsorbancija reakcijske smjese izmjerena je pri 490 nm. Udjel HC izračunat je iz baždarne krivulje za ehinakozid, a rezultati su izraženi u mg ekv. EHI $\text{g}^{-1} \text{ s. tv}$.

Korištena je ista metodologija prethodno opisana u potpoglavlju 3.2.6.4.9. U odnosu na *in vitro* digestiju mikročestica i nanovlakana, u ovom postupku uvedena je simulacija oralne faze probave (eng. *simulated salivary fluid*, SSF) pri čemu je pripremljen SSF fluid s otopljenim enzimom humane salivarne amilaze (75 U mL^{-1} na konačan volumen SSF fluida). Odvaganoj masi bombona (5 g) dodana je termostatirana SSF smjesa uz konstantno miješanje (130 rpm). Nakon 2 minute, SSF faza (pH=7) prekinuta je dodatkom SGF fluida (1:1, *v/v*), pri čemu je nastavljeno praćenje kinetike otpuštanja prema prvotno navedenom protokolu uz definirani volumen uzorkovanja (700 μL) kroz cjelokupni analizirani interval probavne simulacije (182 minuta). Simultano, provedeno je praćenje kinetike otpuštanja udjela ukupnih HC u odnosu na bombon s liofiliziranim, neinkapsuliranim ekstraktom trave ive. Dobiveni rezultati apsorbancija oduzeti su od apsorbancija slijepe probe (punjeni bombon pripremljen bez ekstrakta) i kao takvi uzeti za izračun koncentracije ukupnih HC korištenjem baždarne krivulje za ehinakozid (20-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2.8.3.5. Senzorska analiza

Formulirani punjeni bombonskih proizvodi s inkapsuliranim ekstraktom evaluirani su senzorskom analizom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu prema

ISO standardu (No. 11035) s određenim modifikacijama prema radu Saint-Eve i sur., 2011). Senzorski panel bio je formiran od 20 educiranih panelista (25-50 godina) s prethodnim iskustvom u senzorskoj evaluaciji konditorskih proizvoda. Prethodno je provedena selekcija senzorskih atributa za deskriptivno ocjenjivanje i kvantifikaciju, a prilikom ocjenjivanja posluženi su i bombonski proizvodi proizvedeni na identičan način bez punjenja, a u svrhu upoznavanja sa specifičnostima teksturalnih svojstava ovisno o korištenim omjerima škrobova. Intenzitet odabranih senzorskih atributa: tvrdoće, adhezivnosti, žvakljivosti, konzistencije, slatkoće, gorčine i naknadnog okusa ocijenjen je hedonističkom skalom od 1 („najslabije izražen intenzitet”) do 9 („najjače izražen intenzitet”). Dodatno, gorčina i naknadni okus ocijenjeni su i za punjene žele bombone bez inkorporiranog biljnog ekstrakta.

3.2.9. Statistička obrada podataka

Kompletna statistička obrada za svaku eksperimentalnu grupu podataka provedena je u Excelu (verzija 2016, Microsoft, SAD) te softveru Statistica (verzija 10, TIBCO Software, SAD). Provedena su tri ponavljajuća mjerenja za sve eksperimente, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz pripadajuću standardnu devijaciju. Korišteni su: jednosmjerna analiza varijance (eng. *one way ANOVA*) uz post hoc Tukey test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis te t-test. Za obradu grafova i slika, korišteni su: OriginLab (verzija 8, OriginLab Corporation, SAD).i GraphPad Prism (verzija 8, GraphPad Software Inc., SAD). Za obradu DSC termograma korišten je STARe Software v16.10 (Mettler Toledo GmbH, Njemačka).

4. REZULTATI

4.1. Kemijski sastav trave ive

U svrhu proširenja literaturnih podataka vezanih za nutritivni profil trave ive, istraživanje je započelo određivanjem kemijskog sastava trave ive prikupljene sa šest geografskih lokaliteta unutar Primorske Hrvatske. Određen je ukupan udjel proteina, lipida, vlakana te detaljan sastav makro- i mikroelemenata (Tablice 30), a svi rezultati izraženi su na prethodno određeni udjel suhe tvari biljnog materijala. Udjel suhe tvari ispitivanih uzoraka trave ive iznosio je više od 90 %, čime je osigurana mikrobiološka i kemijska stabilnost uzoraka tijekom skladištenja. Rezultati ukupnog udjela proteina iznosili su između 6,53 % (uzorak TI_6) i 8,40 % (uzorak TI_3), bez značajnih statističkih odstupanja. Udjel lipidne frakcije kretao se u rasponu od 1,36 % (uzorak TI_6) do 3,02 % (uzorak TI_5). Dodatnom karakterizacijom ekstrahirane lipidne frakcije, u svim uzorcima identificirane su tri zasićene masne kiseline (palmitinska, arahidonska i beheninska), oleinska kao jednostruko nezasićena masna kiselina, linoleinska kao dvostruko nezasićena masna kiselina i α -linolenska kao trostruko nezasićena masna kiselina. Analizom ukupnog udjela netopljivih i topljivih vlakana, očekivano je određen visok udjel netopljivih vlakana u svim uzorcima trave ive bez ekstremnih statističkih odstupanja (53,75-57,86 %), uz otprilike devet puta manji udjel topljivih vlakana (6,29-7,76 %). Obzirom na udjel ukupnog mineralnog ostatka, rezultati su iznosili između 5,51-10,20 %, dok su se TI_1 i TI_3 izdvojili kao uzorci s najvišim udjelom ukupnih minerala (TI_1: 8,40 %, TI_3: 10,20 %).

U cilju detaljne karakterizacije makro- i mikroelemenata kao nutritivnih komponenti, dodatno je primijenjena atomska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Prema dobivenim rezultatima (Tablica 31), vidljivo je da je u svim uzorcima određen visok udjel kalcija (Ca) (9795-12108 mg kg⁻¹ s. tv.) i kalija (K) (7668-9986 mg kg⁻¹ s. tv.) u odnosu na magnezij (Mg) (1210-1934 mg kg⁻¹ s. tv.), željezo (Fe) (135-1538 mg kg⁻¹ s. tv.) i fosfor (P) (588-814 mg kg⁻¹ s. tv.). Od 17 istraživanih mikroelemenata, u svim uzorcima istaknuo se udjel bakra (Cu) (5781-7593 μ g g⁻¹ s. tv.), dok su u uzorcima TI_1 (2596 μ g g⁻¹ s. tv.) i TI_3 (μ g g⁻¹ s. tv.) određeni najveći udjeli vanadija (V). Mangan (Mn), cink (Zn) i selen (Se) u svim uzorcima određeni su u najmanjim masenim udjelima (Mn: 21-63 μ g g⁻¹ s. tv.; Zn: 27-42 μ g g⁻¹ s. tv.; Se: 11-38 μ g g⁻¹ s. tv.).

Tablica 30. Kemijski sastav uzoraka trave ive

| Udjel (%) | TI_1 | TI_2 | TI_3 | TI_4 | TI_5 | TI_6 |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| suha tvar | 91,3±0,03 | 91,14±0,06 ^a | 90,22±0,01 | 91,11±0,03 ^a | 90,93±0,02 | 90,67±0,02 |
| proteini ¹ | 7,12±0,09 ^a | 7,50±0,15 ^{ab} | 8,40±0,39 ^{abc} | 7,92±0,07 ^{abcd} | 7,18±0,35 ^{abcde} | 6,53±0,07 ^{abe} |
| lipidi ¹ | 2,03±0,05 ^a | 1,71±0,18 ^{ab} | 1,62±0,11 ^{abc} | 2,21±0,16 ^{abc} | 3,02±0,06 | 1,36±0,14 ^{abc} |
| <i>palmitinska</i> | 10,55±0,89 ^a | 8,83±2,21 ^a | 6,55±1,51 ^a | 7,21±0,42 ^a | 5,71±0,25 ^a | 5,56±0,11 ^a |
| <i>oleinska</i> | 6,37±1,11 ^a | 7,88±2,18 ^{ab} | 11,21±2,67 ^{abc} | 2,31±0,07 ^{abd} | 2,17±0,04 ^{abcde} | 8,54±0,04 ^{abcde} |
| <i>linoleinska</i> | 13,78±0,98 ^a | 17,29±4,02 ^a | 28,05±6,83 ^a | 17,39±0,98 ^a | 16,14±0,32 ^a | 17,33±0,40 ^a |
| <i>α-linoleninska</i> | 15,87±1,28 ^a | 15,40±4,15 ^{ab} | 16,22±3,82 ^{abc} | 35,40±2,07 ^d | 31,56±1,01 ^d | 11,64±0,24 ^{abc} |
| <i>arahidonska</i> | 12,25±2,24 ^a | 7,51±2,50 ^{ab} | 5,22±0,28 ^{abc} | 23,86±1,12 ^d | 18,83±0,65 ^{ade} | 11,15±0,18 ^{abce} |
| <i>beheninska</i> | 0,32±0,07 ^a | 12,04±9,66 ^a | 6,68±5,22 ^a | 3,04±2,33 ^a | 2,08±1,61 ^a | 21,06±0,35 ^a |
| ukupna vlakna ¹ | 60,64±0,10 ^a | 60,35±0,51 ^{ab} | 64,15±0,23 ^c | 63,00±0,51 ^{acd} | 59,63±0,44 ^{abcde} | 61,17±0,22 ^{abc} |
| netopljiva vlakna ¹ | 54,84±0,10 ^a | 53,97±0,50 ^{ab} | 57,86±0,20 | 55,82±0,10 ^{ac} | 54,68±0,32 ^{abc} | 53,75±0,40 ^{abc} |
| topljiva vlakna ^{1*} | 5,80±0,50 ^a | 6,38±0,50 ^a | 6,29±0,00 ^a | 7,18±0,40 ^a | 6,80±0,84 ^a | 7,76±0,22 ^a |
| ukupni pepeo ¹ | 8,40±0,11 | 6,68±0,06 ^a | 10,20±0,39 | 5,51±0,01 ^b | 5,61±0,02 ^{bc} | 5,75±0,05 ^{abc} |

¹ izraženo na suhu tvar biljnog materijala; * vlakna velike molekulske mase. U statističkoj obradi primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post-hoc test. Vrijednosti označene istim slovima u istom retku nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$).

Tablica 31. Sastav makroelemenata i mikroelemenata uzoraka trave ive

| | TI_1 | TI_2 | TI_3 | TI_4 | TI_5 | TI_6 |
|--|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| makroelement (mg kg ⁻¹ s. tv. ⁻¹) | | | | | | |
| Na | 122±21 ^a | 46±4 ^a | 36±6 ^a | 19±1,7 ^a | 52±2 ^a | 28±3 ^a |
| Mg | 1210±89 ^a | 1291±162 ^b | 1703±163 | 1469±57 | 1488±40 | 1934±97 ^{ab} |
| K | 9367±479 | 9588±438 | 8384±315 | 7668±540 | 8116±162 | 9986±584 |
| Ca | 12108±541 | 11060±165 | 10356±378 | 10622±766 | 9822±220 | 9795±673 |
| Fe | 877±158 | 275±64 ^a | 1538±336 ^{ab} | 135±25 ^b | 212±8,8 ^b | 162±15 ^b |
| P | 660±130 | 745±16 | 701±24 | 655±130 | 588±126 | 814±102 |
| mikroelement (µg kg ⁻¹ s. tv. ⁻¹) | | | | | | |
| V | 2596±503 ^a | 878±172 ^{ab} | 4112±252 ^{abc} | 288±62 ^{ac} | 525±10 ^{ac} | 441±44 ^{ac} |
| Mn | 51±5,4 ^a | 33±3,2 ^b | 63±8,8 ^{bc} | 21±2,1 ^{ac} | 30±2,5 ^c | 21±1,8 ^{ac} |
| Cr | 2432±55 ^a | 2608±435 ^b | 2969±72 ^c | 504±81 ^{abc} | 919±75 ^{abc} | 428±36 ^{abc} |
| Co | 431±38,2 ^a | 225±36,6 ^{ab} | 576±9,4 ^{abc} | 75±9,2 ^{abc} | 138±2,8 ^{ac} | 102±4,7 ^{ac} |
| Ni | 1235±37 ^a | 615±158 ^b | 1931±191 ^{abc} | 312±54 ^{ac} | 512±145 ^{ac} | 502±11 ^{ac} |
| Cu | 7593±257 ^a | 6128±147 | 7580±563 ^b | 5817±255 ^{ab} | 6190±208 | 5781±222 ^{ab} |
| Zn | 40±1,4 ^a | 28±0,5 ^{ab} | 42±2,1 ^{bc} | 27±2,1 ^{ac} | 30±0,5 ^{ac} | 33±0,8 ^c |
| As | 331±56,0 ^a | 95±22,5 ^{ab} | 927±43,2 ^{abc} | 47±7,3 ^{ac} | 75±2,0 ^{ac} | 94±9,9 ^{ac} |
| Se | 29±3,9 ^a | 30±1,7 ^b | 38±5,0 ^c | 20±2,7 ^c | 16±2,7 ^c | 11±1,4 ^{abc} |
| Mo | 320±48,6 ^a | 384±29,0 ^b | 453±8,8 ^c | 241±10,8 ^{cd} | 595±20,4 ^{abd} | 726±18,9 ^{abcd} |
| Cd | 59±1,4 ^a | 32±4,5 ^{ab} | 54±1,0 ^{bc} | 4,8±0,5 ^{abc} | 18±3,1 ^{abc} | 8,7±0,7 ^{abc} |
| Sn | 72±13,4 | 71±12,2 | 90±8,8 ^a | 26±3,4 ^a | 46±13,8 | 25±3,1 ^a |
| Sb | 20±3,3 | 15±2,8 | 32±4,8 ^a | 9,1±1,5 ^a | 17±3,7 | 11±0,4 ^a |
| Hg | 10±0,4 | 7,8±0,7 ^a | 14,1±1,6 ^{ab} | 5,9±1,0 ^{bc} | 9,7±0,8 | 14,6±0,5 ^{ac} |
| Ti | 46±6,3 ^a | 11,6±1,3 ^a | 29,4±1,8 ^b | 10±1,4 ^{ab} | 20,1±4,5 ^a | 16,7±0,7 ^a |
| Pb | 974±3,1 ^a | 314±6 ^{ab} | 2160±106 ^{abc} | 223±36,8 ^{acd} | 520±55 ^{acd} | 243±24,7 ^{ac} |
| Al | 630±26 ^a | 277±20 ^{ab} | 478±29 ^{abc} | 97±15,8 ^{abcd} | 264±22 ^{acde} | 110±7,0 ^{abc} |

¹ izraženo na suhu tvar biljnog materijala. U statističkoj obradi primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post-hoc test. Vrijednosti označene istim slovima u istom stupcu su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

4.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata trave ive

Karakterizaciji sastava polifenolnih spojeva vodenih ekstrakata trave ive prethodio je preparativni postupak ekstrakcije primjenom konvencionalne tehnike zagrijavanja (HAE) te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ekstrakcije subkritičnom vodom (SWE). U cilju postizanja maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva, provedena je optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za sve tri tehnike primjenom metode odzivne površine u softverskom paketu Design Expert na uzoraku TI_5. Sukladno planu, u svim pripremljenim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet, te su na osnovi dobivenih rezultata (najveći bioaktivni potencijal) definirani optimalni uvjeti ekstrakcije.

4.2.1. Optimizacija ekstrakcije polifenola konvencionalnom tehnikom

Provedba konvencionalne ekstrakcije uključivala je ukupno 16 eksperimenata pri definiranim nezavisnim varijablama ili procesnim parametrima (X_1 : temperatura, X_2 : vrijeme, X_3 : uzorak:otapalo), dok je za potvrdu ekstrakcijske učinkovitosti određivan udjel ukupnih polifenola (TPC) te antioksidacijski kapacitet (DPPH i ABTS metode) (Tablica 32). Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da su najniže TPC-a (20,83 i 23,27 mg GAE g⁻¹ s. tv.¹), ABTS (0,111 i 0,115 mmol TE g⁻¹ s. tv.) i DPPH (0,087 mmol TE g⁻¹ s. tv.) vrijednosti dobivene za uvjete pri 80 °C i najmanjem omjeru uzorka i otapala (1 g : 25 mL), dok je najveća ekstrakcijska učinkovitost određena je u uzorku ekstrahiranom pri 100 °C i s najvećim omjerom uzorka i otapala (1 g : 100 mL), neovisno o duljini trajanja ekstrakcije (TPC: 52,16 i 55,14 mg GAE g⁻¹ s. tv.¹, ABTS: 0,240 i 0,246 mmol TE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,284 i 0,290 mmol TE g⁻¹ s. tv.).

Eksperimentalno dobivene zavisne ili odzivne varijable aproksimirane su statističkom metodom nelinearne regresije pri čemu su dobiveni modeli s regresijskim koeficijentima, a koji predstavljaju odzivnu funkciju TPC, ABTS i DPPH rezultata ovisnu o testiranim procesnim parametrima. Tako su vrijednosti TPC-a aproksimirane polinomom drugog reda (kvadratni model), dok su DPPH i ABTS eksperimentalne varijable opisane linearnim modelom kako slijedi:

$$\text{TPC (mg GAE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 33,58 + 7,81X_1 + 0,6100X_2 - 7,99X_3 + 0,5325X_1X_2 - 0,8300X_1X_3 - 0,8225X_2X_3 + 3,11X_1^2 - 0,9809X_2^2 + 1,49X_3^2 \quad [7]$$

$$\text{DPPH (mmol TE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 0,1717 + 0,0425 X_1 + 0,0063X_2 - 0,0535X_3 \quad [8]$$

$$\text{ABTS (mmol TE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 0,1731 + 0,0299 X_1 + 0,0010X_2 - 0,0344X_3 \quad [9]$$

pri čemu je X_1 =temperatura, X_2 =vrijeme, X_3 =omjer uzorka i otapala

Tablica 32. Dizajn eksperimenta i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta za HAE tehniku

| Redni broj eksperimenta | NEZAVISNE VARIJABLE | | | EKSPERIMENTALNE VRIJEDNOSTI | | |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|--|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | X_1 : temperatura (°C) | X_2 : vrijeme (min) | X_3 : omjer uzorka i otapala (g mL ⁻¹) | TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv. ¹) | ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) |
| 1 | 100 | 30 | 1:100 | 55,14±0,78 | 0,246±0,00 | 0,290±0,00 |
| 2 | 80 | 30 | 1:100 | 36,90±1,09 | 0,176±0,00 | 0,188±0,00 |
| 3 | 80 | 20 | 1:40 | 30,15±0,45 | 0,158±0,00 | 0,138±0,00 |
| 4 | 100 | 30 | 1:25 | 36,49±1,34 | 0,171±0,00 | 0,155±0,00 |
| 5 | 100 | 20 | 1:40 | 44,71±0,44 | 0,198±0,00 | 0,206±0,00 |
| 6 | 90 | 10 | 1:40 | 31,73±0,38 | 0,164±0,00 | 0,153±0,00 |
| 7 | 90 | 10 | 1:40 | 31,57±1,59 | 0,157±0,01 | 0,143±0,00 |
| 8 | 90 | 30 | 1:40 | 35,11±0,02 | 0,162±0,00 | 0,177±0,00 |
| 9 | 100 | 10 | 1:100 | 52,16±0,42 | 0,240±0,00 | 0,284±0,00 |
| 10 | 80 | 30 | 1:25 | 20,83±0,69 | 0,111±0,00 | 0,087±0,00 |
| 11 | 80 | 10 | 1:25 | 23,27±0,10 | 0,115±0,00 | 0,087±0,00 |
| 12 | 90 | 20 | 1:25 | 27,28±0,58 | 0,136±0,00 | 0,124±0,00 |
| 13 | 80 | 10 | 1:100 | 35,31±0,67 | 0,173±0,00 | 0,175±0,00 |
| 14 | 100 | 10 | 1:25 | 36,06±0,47 | 0,177±0,00 | 0,165±0,00 |
| 15 | 90 | 20 | 1:40 | 32,48±0,38 | 0,168±0,00 | 0,159±0,00 |
| 16 | 90 | 20 | 1:100 | 44,35±0,76 | 0,219±0,00 | 0,216±0,00 |

GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-ekvivalenti Trolox-a

Provedena je i statistička analiza varijance (ANOVA) prikladnosti pojedinog matematičkog modela za testirane odzivne varijable (Tablica 33). Prihvatljivost pojedinog matematičkog modela procijenjena je prema maksimalnoj vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2), kao parametra korelacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti s vrijednostima predviđenima modelom (R^2_{TPC} : 0,9990, R^2_{DPPH} : 0,9518, R^2_{ABTS} : 0,9414), te ustanovljenoj statističkoj značajnosti modela ($p < 0,05$) deriviranoj iz F -vrijednosti, kao statističkog parametra za procjenu statistički značajno različite ovisnosti odzivnih varijabli o većem broju nezavisnih varijabli i njihovih interakcija. Dodatno, vrijednost prilagođenih koeficijenata determinacije (R^2 prilagođen TPC=0,9268, R^2 prilagođen DPPH=0,9397, R^2

prilagođen ABTS=0,9750) ne odstupaju značajno od izvornih R^2 za sve tri ispitivane varijable, a što je potvrda zadovoljavajuće prediktivnosti modela u varijaciji odgovora odzivnih varijabli, prilagođenog za ukupan broj nezavisnih varijabli u modelu. Prema vrijednostima tzv. adekvatne preciznosti (poželjno je > 4) za odzive TPC (29,1925), ABTS (25,1608) i DPPH (29,0224), koeficijentu varijance (eng. *coefficient of variance*, CV), kao indikatoru reproducibilnosti modela (TPC: 4,15 %, DPPH: 8,21 % , ABTS: 6,00 %), te statistički neznačajnom nedostatku modela (eng. *lack of fit F-value*) pri $p>0,05$, predloženi regresijski modeli mogu se smatrati prikladnima za definiranje ovisnosti eksperimentalno mjerene ekstrakcijske učinkovitosti o zadanoj temperaturi, vremenu i omjeru uzorka i otapala. Prema dobivenim statističkim rezultatima (Tablica 33), može se zaključiti da su temperatura kao linearni (X_1) i kvadratni član (X_1^2) te omjer uzorka i otapala (X_3) imali značajan učinak na udjel TPC-a, kao i linearni članovi temperatura (X_1) te omjer uzorka i otapala (X_3) na izmjereni antioksidacijski kapacitet ekstrakata ($p<0,05$).

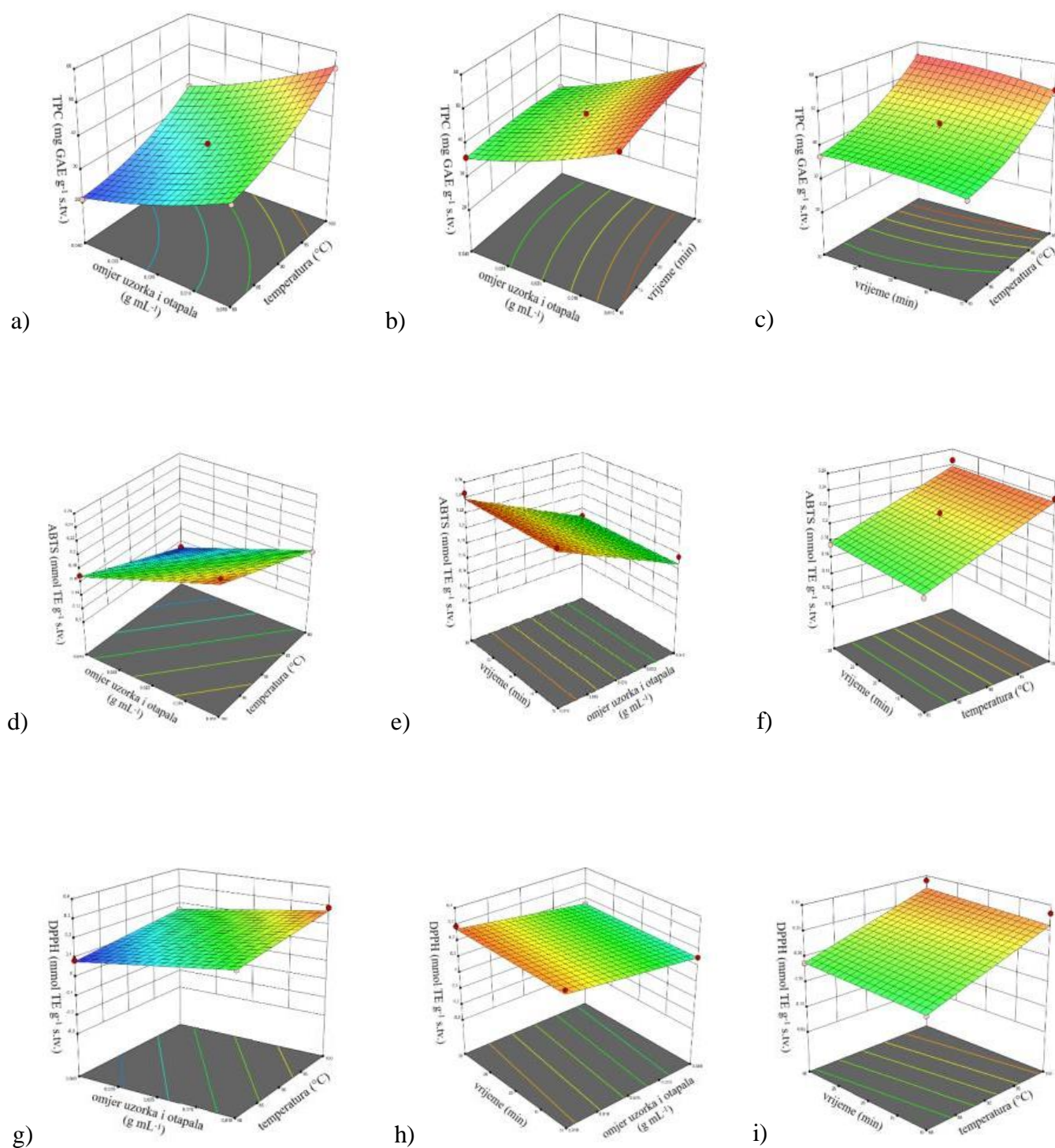
Vizualizacija utjecaja temperature te omjera uzorka i otapala na odzivne varijable prikazana je trodimenzionalnim dijagramima odzivnih površina, a koje predstavljaju modelom predviđene eksperimentalne vrijednosti u ovisnosti o dvije nezavisne varijable. Na Slici 21a-i, može se uočiti značajan lineran porast udjela TPC-a, kao i ABTS te DPPH vrijednosti povišenjem temperature (s 80 na 100 °C) i volumena otapala u odnosu na masu uzorka (1 g : 25 mL do 1 g : 100 mL), kao i da nije bilo statistički značajnog utjecaja vremena na ekstrakcijsku učinkovitost određivanu na osnovu ta tri parametra ($p>0,05$).

Korištenjem regresijskih jednadžbi, određeni su optimalni ekstrakcijski parametri za konvencionalnu ekstrakciju: 100 °C, 10 minuta i 1 g : 100 mL vode. Obzirom na zadovoljavajuće vrijednosti relativnih pogreški (1,18 %, 5,83 %, 3,36 %) u izračunu predviđenih vrijednosti za TPC (55,80 mg GAE g⁻¹ s. tv.), ABTS (0,274 mmol TE g⁻¹ s. tv.) i DPPH (0,238 mmol TE g⁻¹ s. tv.) pri optimiranim parametrima, a koji su u konačnici vrlo slični eksperimentalno određenim vrijednostima (TPC: 55,14 mg GAE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,246 mmol TE g⁻¹ s. tv, DPPH: 0,290 mmol TE g⁻¹ s. tv.), može se zaključiti da se predloženi matematički modeli pri definiranim eksperimentalnim uvjetima mogu primijeniti u optimizaciji konvencionalne ekstrakcije.

Tablica 33. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za modele HAE tehniku

| TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | | |
|--|--|---------|----|--------|---------------|--------------------|--|
| | Izvor varijabilnosti | SS | df | MS | F-vrijednost | p-vrijednost | |
| KVADRATNI MODEL | Model | 1314,44 | 9 | 146,05 | 66,05 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 13,27 | 6 | 2,21 | | | |
| | Nedostatak modela | 12,99 | 5 | 2,60 | 9,23 | 0,2446 | |
| | Čista pogreška | 0,2812 | 1 | 0,2812 | | | |
| | Ukupna korelacija | 1327,71 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 609,96 | 1 | 609,96 | 275,87 | < 0,0001 | |
| | X ₂ :vrijeme | 3,72 | 1 | 3,72 | 1,68 | 0,2422 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 638,88 | 1 | 638,88 | 288,95 | < 0,0001 | |
| | X ₁ X ₂ | 2,27 | 1 | 2,27 | 1,03 | 0,3502 | |
| | X ₁ X ₃ | 5,51 | 1 | 5,51 | 2,49 | 0,1655 | |
| | X ₂ X ₃ | 5,41 | 1 | 5,41 | 2,45 | 0,1687 | |
| | X ₁ ² | 25,49 | 1 | 25,49 | 11,53 | 0,0146 | |
| | X ₂ ² | 2,54 | 1 | 2,54 | 1,15 | 0,3253 | |
| | X ₃ ² | 5,89 | 1 | 5,89 | 2,66 | 0,1539 | |
| R ² =0,9990; R ² prilagođen=0,9750; R ² predviđen=0,9426; CV=4,15 %; adekvatna preciznost=29,1925 | | | | | | | |
| DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | | |
| LINEARNI MODEL | Model | 0,0471 | 3 | 0,0157 | 78,95 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 0,0024 | 12 | 0,0002 | | | |
| | Nedostatak modela | 0,0024 | 11 | 0,0002 | 11,96 | 0,2222 | |
| | Čista pogreška | 0,0000 | 1 | 0,0000 | | | |
| | Ukupna korelacija | 0,0495 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 0,0181 | 1 | 0,0181 | 90,86 | < 0,0001 | |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0004 | 1 | 0,0004 | 2,00 | 0,1831 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0286 | 1 | 0,0286 | 143,98 | < 0,0001 | |
| | R ² =0,9518; R ² prilagođen=0,9397; R ² predviđen=0,9110; CV=8,21 %; adekvatna preciznost=29,0224 | | | | | | |
| | ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | |
| LINEARNI MODEL | Model | 0,0208 | 3 | 0,0069 | 64,28 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 0,0013 | 12 | 0,0001 | | | |
| | Nedostatak modela | 0,0013 | 11 | 0,0001 | 3,58 | 0,3922 | |
| | Čista pogreška | 0,0000 | 1 | 0,0000 | | | |
| | Ukupna korelacija | 0,0221 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 0,0089 | 1 | 0,0089 | 82,96 | < 0,0001 | |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,0928 | 0,7659 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0118 | 1 | 0,0118 | 109,80 | < 0,0001 | |
| | R ² =0,9414; R ² prilagođen=0,9268; R ² predviđen=0,9065; CV=6,00 %; adekvatna preciznost=25,1608 | | | | | | |

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca; CV- koeficijent varijance. Utjecaj faktora je statistički značajan uz p<0,05.



Slika 21. Trodimenzijski prikazi ovisnosti interakcije nezavisnih varijabli pri konvencionalnim uvjetima ekstrakcije o izlaznim varijablama procesa: a-c) udjel ukupnih polifenola (TPC), d-f) antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom i g-i) antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom.

4.2.2. Optimizacija ekstrakcije polifenola potpomognuta mikrovalovima

Eksperimentalni plan za optimizaciju ekstrakcije potpomognute mikrovalovima uključivao je isto 16 eksperimenata (Tablica 34). Najniže vrijednosti svih odzivnih varijabli određene su pri najmanjem omjeru uzorka i otapala (1 g : 25 mL), 50 °C i 9 minuta (TPC: 20,35 mg GAE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,085 mmol TE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,098 mmol TE g⁻¹ s. tv.), 50 °C i 3 minute (TPC: 24,91 mg GAE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,100 mmol TE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,094 mmol TE g⁻¹ s. tv.), te 90 °C i 3 minuta (TPC: 22,10 mg GAE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,105 mmol TE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,111 mmol TE g⁻¹ s. tv.). Sličan trend ovisnosti eksperimentalnih parametara o procesnim varijablama ekstrakcijskog procesa, kao i kod optimizaciji konvencionalne ekstrakcije, može se primijetiti prema definiranim regresijskim jednadžbama izračunatim u Design Expertu kako slijedi:

$$\text{TPC (mg GAE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 33,69 + 3,06 X_1 + 0,7470 X_2 - 9,16 X_3 \quad [10]$$

$$\text{DPPH (mmol TE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 0,1805 + 0,0316 X_1 - 0,0019 X_2 - 0,0760 X_3 - 0,0041 X_1 X_2 - 0,0266 X_1 X_3 - 0,0001 X_2 X_3 \quad [11]$$

$$\text{ABTS (mmol TE g}^{-1}\text{ s. tv.)} = 0,1566 + 0,0304 X_1 + 0,0079 X_2 - 0,0495 X_3 \quad [12]$$

pri čemu je X_1 =temperatura, X_2 =vrijeme, X_3 =omjer uzorka i otapala

Određeni su linearni matematički modeli za TPC i ABTS rezultate te model dvofaktorske interakcije (eng. *2FI model*) za DPPH rezultate, a što upućuje na značaj specifičnih interakcija ($p < 0,05$) između procesnih varijabli pri optimizaciji ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, a što nije bio slučaj kod konvencionalne ekstrakcije. Prema jednadžbama [10], [11] i [12] pripadajućim regresijskim koeficijentima za X_1 , X_2 te X_3 , jasno se može predvidjeti porast TPC, ABTS i DPPH vrijednosti s povišenjem temperature, kao i negativan utjecaj smanjenja omjera uzorka i otapala na finalni rezultat, ukoliko se preostale dvije varijable drže fiksima. Iznimno, regresijski član interakcije $-0,0266 X_1 X_3$ u jednadžbi za odziv DPPH [11] prema rezultatima ANOVA testa kvantitativno izražava statističku značajnost interakcije temperature te omjera uzorka i otapala, s negativnim utjecajem na odzivne varijable ukoliko se snize X_1 i/ili X_3 .

Tablica 34. Dizajn eksperimenta i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta za MAE tehniku

| Redni broj eksperimenta | NEZAVISNE VARIJABLE | | | EKSPERIMENTALNE VRIJEDNOSTI | | |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | X ₁ : temperatura (°C) | X ₂ : vrijeme (min) | X ₃ : omjer uzorka i otapala (g mL ⁻¹) | TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv.) | ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) |
| 1 | 90 | 3 | 1:100 | 47,95±0,64 | 0,252±0,00 | 0,329±0,00 |
| 2 | 70 | 3 | 1:40 | 33,21±0,31 | 0,152±0,00 | 0,197±0,00 |
| 3 | 50 | 9 | 1:25 | 20,35±0,84 | 0,085±0,00 | 0,098±0,00 |
| 4 | 90 | 3 | 1:25 | 22,10±0,60 | 0,105±0,00 | 0,111±0,00 |
| 5 | 70 | 9 | 1:40 | 35,24±1,00 | 0,158±0,01 | 0,179±0,00 |
| 6 | 50 | 6 | 1:40 | 27,22±0,62 | 0,088±0,00 | 0,122±0,00 |
| 7 | 90 | 6 | 1:40 | 37,04±2,15 | 0,175±0,01 | 0,175±0,00 |
| 8 | 70 | 6 | 1:40 | 30,09±0,53 | 0,141±0,00 | 0,174±0,00 |
| 9 | 90 | 9 | 1:25 | 27,34±1,17 | 0,145±0,01 | 0,106±0,00 |
| 10 | 50 | 3 | 1:100 | 37,62±0,31 | 0,165±0,00 | 0,198±0,01 |
| 11 | 70 | 6 | 1:40 | 31,16±0,50 | 0,181±0,00 | 0,201±0,00 |
| 12 | 90 | 9 | 1:100 | 48,29±0,35 | 0,265±0,01 | 0,317±0,00 |
| 13 | 70 | 6 | 1:25 | 27,50±0,33 | 0,123±0,00 | 0,131±0,00 |
| 14 | 50 | 3 | 1:25 | 24,91±0,15 | 0,100±0,01 | 0,094±0,00 |
| 15 | 70 | 6 | 1:100 | 37,91±0,18 | 0,171±0,00 | 0,246±0,01 |
| 16 | 50 | 9 | 1:100 | 42,04±1,13 | 0,200±0,00 | 0,210±001 |

GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-ekvivalenti Trolox-a

Prema rezultatima analize varijance (Tablica 35), linearni model za TPC karakterizira poželjan koeficijent determinacije ($R^2=0,8616$), kao i prikladan prilagođeni R^2 (0,8269), zadovoljavajuća adekvatna preciznost (14,6312) i granična vrijednost koeficijenta varijance (CV: 10,52 %). Optimalni parametri za DPPH rezultate definirani su 2FI modelom ($R^2=0,9500$; R^2 prilagođen=0,9167; R^2 predviđen=0,8827; CV=11,49 %; adek. preciznost=16,2712), dok dobiveni statistički podaci za linearni model ABTS odziva, poput CV vrijednosti iznad 10 % ili nedovoljno usklađenih koeficijenata determinacije ($R^2=0,8347$; R^2 prilagođen=0,7933) otvaraju mogućnost eventualnog poboljšanja matematičkog modela s mogućim pristupom zamjene ili uključivanja pojedinih procesnih varijabli, povećanja broja centralnih ponavljajućih mjerenja (u ovom slučaju, to su bila mjerenja pri 70 °C, 6 minuta i pri omjeru uzorka i otapala

od 1 g : 40 mL) i sl. Iz p -vrijednosti ($p < 0,05$) može se potvrditi statistički značajan utjecaj temperature (X_1) te omjera uzorka i otapala (X_3) za prediktivni TPC, ABTS i DPPH odgovor, te dodatno, i njihove međusobne interakcije (X_1X_3) u postizanju maksimalne ekstrakcije učinkovitosti kod DPPH modela prilikom primjene mikrovalno potpomognute ekstrakcije.

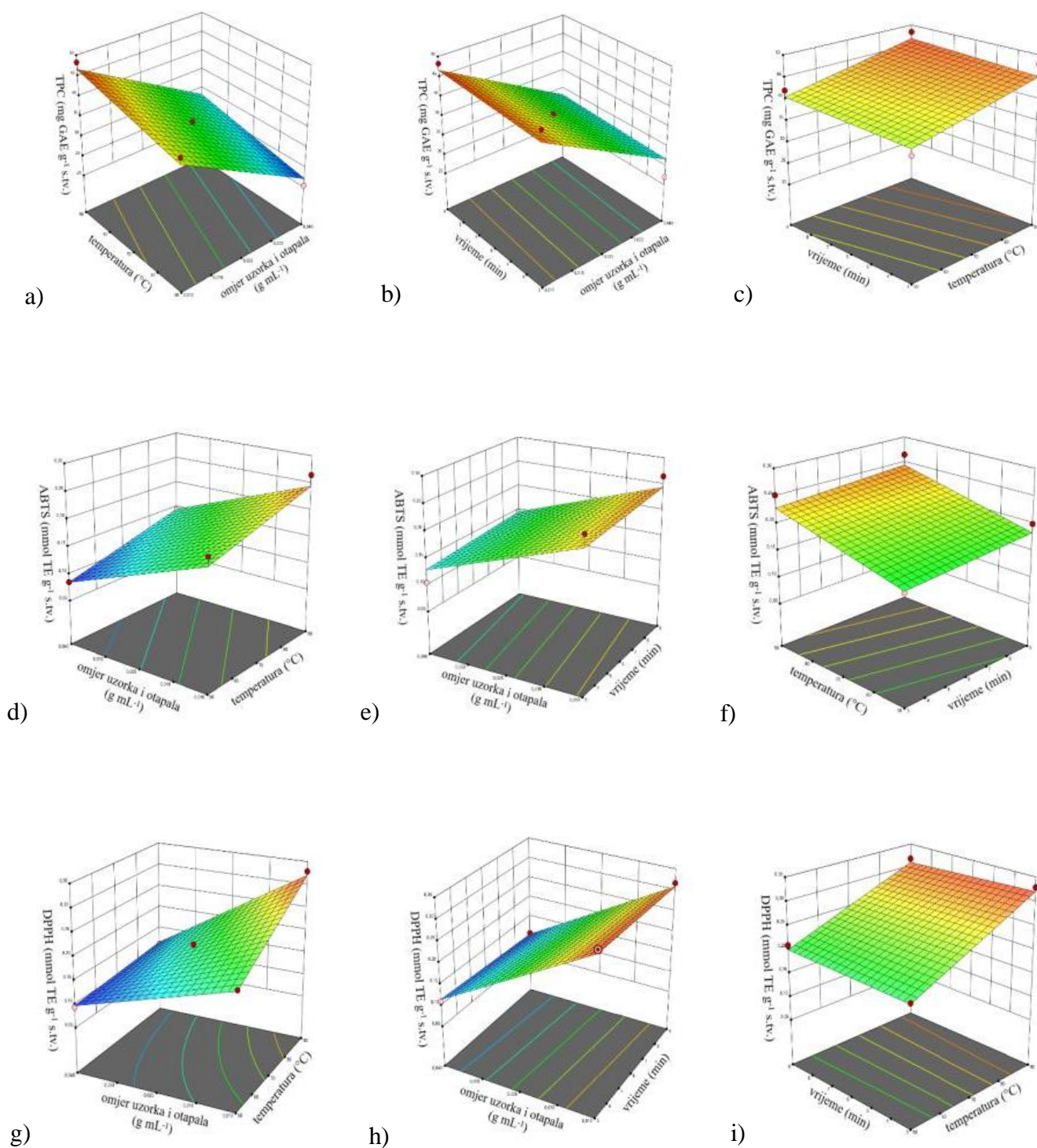
Prema trodimenzionalnim dijagramima za prediktivne modele TPC, ABTS i DPPH varijabli pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovim (Slika 22a-i), jasno se uočava linearno pozitivan učinak na testirane varijable postepenim povećanjem temperature s 50 °C do konačnih 90 °C, odnosno povećanjem omjera uzorka i otapala s 1 g : 25 mL do najpovoljnijih 1g : 100 mL, a u cilju ekstrakcije što većeg udjela ukupnih polifenola i spojeva s kapacitetom neutralizacije DPPH te ABTS radikala. Vrijeme se pokazalo kao statistički neznačajna varijabla za optimizaciju ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, odnosno bez utjecaja na statistički značajno smanjenje ili povećanje testiranih odziva.

Određeni su optimalni ekstrakcijski uvjeti (90 °C, 1 g : 100 mL, 9 minuta), a u svrhu njihove verifikacije dodatno je provedena usporedba predviđenih odgovora s ekperimentalno dobivenima. Sukladnost eksperimentalnih vrijednosti (TPC: 48,29 mg GAE g⁻¹ s. tv., 0,317 mmol TE g⁻¹ s. tv., 0,265 mmol TE g⁻¹ s. tv.) s predviđenima na osnovu odabranih matematičkih modela (TPC: 46,66 mg GAE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,320 mmol TE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,244 mmol TE g⁻¹ s. tv.) potvrđena je i zadovoljavajućim relativnim greškama manjima od 10 % (TPC: 3,49 %, DPPH: 2,81 %, ABTS: 8,61 %).

Tablica 35. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za modele MAE tehniku

| TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | | |
|---|---|---------|-----------------------|--------|---------------|--------------------|--|
| | Izvor varijabilnosti | SS | df | MS | F-vrijednost | p-vrijednost | |
| LINEARNI MODEL | Model | 938,33 | 3 | 312,78 | 24,89 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 150,78 | 12 | 12,57 | | | |
| | Nedostatak modela | 109,29 | 11 | 9,94 | 0,2394 | 0,9343 | |
| | Čista pogreška | 41,50 | 1 | 41,50 | | | |
| | Ukupna korelacija | 1089,12 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 93,51 | 1 | 93,51 | 7,44 | 0,0183 | |
| | X ₂ :vrijeme | 5,58 | 1 | 5,58 | 0,4441 | 0,5178 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 839,24 | 1 | 839,24 | 66,79 | < 0,0001 | |
| | R ² =0,8616; R ² prilagođen=0,8269; R ² predviđen=0,7585; CV=10,52 %; adek. preciznost=14,6312 | | | | | | |
| | DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | |
| 2FI MODEL* | Model | 0,0736 | 6 | 0,0123 | 28,52 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 0,0039 | 9 | 0,0004 | | | |
| | Nedostatak modela | 0,0035 | 8 | 0,0004 | 1,20 | 0,6115 | |
| | Čista pogreška | 0,0004 | 1 | 0,0004 | | | |
| | Ukupna korelacija | 0,0775 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 0,0100 | 1 | 0,0100 | 23,22 | 0,0009 | |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,0839 | 0,7786 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0578 | 1 | 0,0578 | 134,29 | < 0,0001 | |
| | X ₁ X ₂ | 0,0001 | 1 | 0,0001 | 0,3165 | 0,5875 | |
| | X ₁ X ₃ | 0,0057 | 1 | 0,0057 | 13,19 | 0,0055 | |
| X ₂ X ₃ | 1,25*10 ⁻⁷ | 1 | 1,25*10 ⁻⁷ | 0,0003 | 0,9868 | | |
| R ² =0,9500; R ² prilagođen=0,9167; R ² predviđen=0,8827; CV=11,49 %; adek. preciznost=16,2712 | | | | | | | |
| ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | | |
| LINEARNI MODEL | Model | 0,0344 | 3 | 0,0115 | 20,19 | < 0,0001 | |
| | Ostatak | 0,0068 | 12 | 0,0006 | | | |
| | Nedostatak modela | 0,0060 | 11 | 0,0005 | 0,6827 | 0,7485 | |
| | Čista pogreška | 0,0008 | 1 | 0,0008 | | | |
| | Ukupna korelacija | 0,0412 | 15 | | | | |
| | X ₁ :temperatura | 0,0092 | 1 | 0,0092 | 16,29 | 0,0017 | |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0006 | 1 | 0,0006 | 1,10 | 0,3149 | |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0245 | 1 | 0,0245 | 43,19 | < 0,0001 | |
| | R ² =0,8347; R ² prilagođen=0,7933; R ² predviđen=0,6992; CV=15,21 %; adek. preciznost=14,7452 | | | | | | |

*model interakcije dva faktora; SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca. Utjecaj faktora je statistički značajan uz p<0,05.



Slika 22. Trodimenzijski prikazi ovisnosti interakcije nezavisnih varijabli pri uvjetima mikrovalno potpomognute ekstrakcije o izlaznim varijablama procesa: a-c) udjel ukupnih polifenola (TPC), d-f) antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom i g-i) antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom.

4.2.3. Optimizacija ekstrakcije polifenola subkritičnom vodom

Za optimizaciju ekstrakcije polifenola iz trave ive primjenom subkritičnom vodom također je primijenjen centralno-kompozitni dizajn uz tri definirane procesne varijable: temperaturu od 120, 160 i 200 °C, vrijeme ekstrakcije od 5, 10 i 15 minuta te omjer uzorka i otapala od 1 g : 25 mL, 1 g : 40 mL i 1 g : 100 mL. Odzivne varijable bile su identične kao i kod prethodno optimirane konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Prema provedenim kombinacijama eksperimentalnog plana (16 eksperimenata), u Design Expertu proračunati su regresijski modeli, odnosno odzivne funkcije prvog reda za TPC, te funkcije polinoma drugog stupnja (tzv. kvadratni model) za DPPH i ABTS odzive, kako slijedi:

$$\text{TPC (mg GAE g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 48,53 + 14,12 X_1 + 1,91 X_2 - 15,35 X_3 \quad [13]$$

$$\text{DPPH (mmol TE g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1705 + 0,0404 X_1 + 0,0026 X_2 - 0,0821 X_3 - 0,0009 X_1 X_2 - 0,0169 X_1 X_3 + 0,0021 X_2 X_3 - 0,0043 X_1^2 - 0,0093 X_2^2 + 0,0248 X_3^2 \quad [14]$$

$$\text{ABTS (mmol TE g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,2729 + 0,0916 X_1 + 0,0078 X_2 - 0,0877 X_3 - 0,0012 X_1 X_2 - 0,0400 X_1 X_3 + 0,0040 X_2 X_3 - 0,0627 X_1^2 - 0,0257 X_2^2 + 0,0578 X_3^2 \quad [15]$$

pri čemu je X_1 =temperatura, X_2 =vrijeme, X_3 =omjer uzorka i otapala

Iz određenog koeficijenta linearnog člana X_1 za TPC (14,12 X_1), DPPH (0,0404 X_1) i ABTS (0,0916 X_1) odzive, vidljiv je najveći utjecaj temperature među primijenjenim procesnim varijablama, na povećanje ekstrakcijske učinkovitosti. Nasuprot tome, linearni član X_3 pokazuje obrnuto proporcionalan učinak na sve tri odzivne varijable, kao i interaktivni član umnoška $X_1 X_3$.

Dobivene vrijednosti za TPC, DPPH i ABTS kretale su se u rangu od 19,39-84,50 mg GAE g⁻¹ s. tv., odnosno 0,094-0,350 i 0,094-448 mmol TE g⁻¹ s. tv., pri čemu su najmanje vrijednosti za sve tri testirane varijable određene pri 120 °C, 5 minuta i omjeru uzorka i otapala od 1 g : 25 mL, a najveće pri ekstrakcijskim uvjetima od 200 °C, 15 minuta i omjeru uzorka i otapala od 1 g : 100 mL (Tablica 36).

Tablica 36. Dizajn eksperimenta i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta za SWE tehniku

| Redni broj eksperimenta | NEZAVISNE VARIJABLE | | | EKSPERIMENTALNE VRIJEDNOSTI | | |
|-------------------------|---|--------------------------------------|---|---|---|---|
| | X ₁ : temperatura (°C) | X ₂ : vrijeme (min) | X ₃ : omjer uzorka i otapala (g mL ⁻¹) | TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv. ¹) | ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) |
| 1 | 160 | 10 | 1:100 | 62,72±0,99 | 0,302±0,01 | 0,260±0,00 |
| 2 | 200 | 15 | 1:25 | 41,99±0,82 | 0,220±0,00 | 0,148±0,00 |
| 3 | 160 | 15 | 1:40 | 54,78±0,40 | 0,266±0,00 | 0,180±0,00 |
| 4 | 120 | 5 | 1:100 | 43,75±0,49 | 0,188±0,00 | 0,240±0,00 |
| 5 | 120 | 10 | 1:40 | 29,51±0,59 | 0,128±0,00 | 0,127±0,00 |
| 6 | 200 | 5 | 1:100 | 84,33±0,82 | 0,448±0,00 | 0,350±0,00 |
| 7 | 160 | 10 | 1:40 | 49,50±0,40 | 0,260±0,00 | 0,176±0,00 |
| 8 | 160 | 10 | 1:40 | 54,39±0,66 | 0,267±0,00 | 0,178±0,00 |
| 9 | 200 | 15 | 1:100 | 84,50±0,33 | 0,458±0,00 | 0,353±0,00 |
| 10 | 160 | 10 | 1:25 | 42,69±0,12 | 0,213±0,00 | 0,124±0,00 |
| 11 | 120 | 5 | 1:25 | 19,39±0,16 | 0,094±0,00 | 0,094±0,00 |
| 12 | 120 | 15 | 1:25 | 24,34±0,08 | 0,125±0,00 | 0,109±0,00 |
| 13 | 160 | 5 | 1:40 | 45,74±0,46 | 0,238±0,00 | 0,173±0,00 |
| 14 | 200 | 10 | 1:40 | 54,06±0,07 | 0,302±0,00 | 0,216±0,00 |
| 15 | 120 | 15 | 1:100 | 45,73±0,16 | 0,187±0,00 | 0,238±0,00 |
| 16 | 200 | 5 | 1:25 | 39,07±0,78 | 0,210±0,00 | 0,145±0,00 |

GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-ekvivalenti Trolox-a

Sva tri odzivna modela odabrana su prema određenim statistički značajnim vrijednostima ($p < 0,05$) prethodno deriviranih iz F -vrijednosti (Tablica 37). Obzirom da nedostatak modela nije statistički značajan ($p > 0,05$), te dobivene realne i prilagođene koeficijente determinacije, vrijednosti koeficijenta varijacije i preciznosti modela kao omjera odzivnog signala i mogućeg šuma, generirani matematički modeli za TPC ($R^2=0,8988$; R^2 prilagođen=0,8735; CV=13,22 %; adek. preciznost=19,5661), DPPH ($R^2=0,9919$; R^2 prilagođen=0,9798; CV=5,69 %; adek. preciznost=28,7215) i ABTS ($R^2=0,9813$; R^2 prilagođen=0,9533; R^2 predviđen=0,8412; CV=9,72 %; adek. preciznost=19,1837) mogu se smatrati prikladnima za željenu optimizaciju ekstrakcije subkritičnom vodom. Isto kao i kod prethodno analiziranih optimizacija, temperatura te omjer uzorka i otapala određeni su kao

statistički značajno različite linearne procesne varijable za ekstrakciju TPC-a. U slučaju ABTS odziva, vidljiv je značajan linearan učinak temperature (X_1), omjera uzorka i otapala (X_3) i njihove međusobne interakcije (X_1X_3) te kvadratnih članova temperature (X_1^2) i omjera uzorka i otapala (X_3^2) ($p < 0,05$). Iznimno kod DPPH rezultata, primijećen je statistički značajan učinak linearnog člana vremena ekstrakcije (X_2) te kvadratnog člana omjera uzorka i otapala (X_3^2).

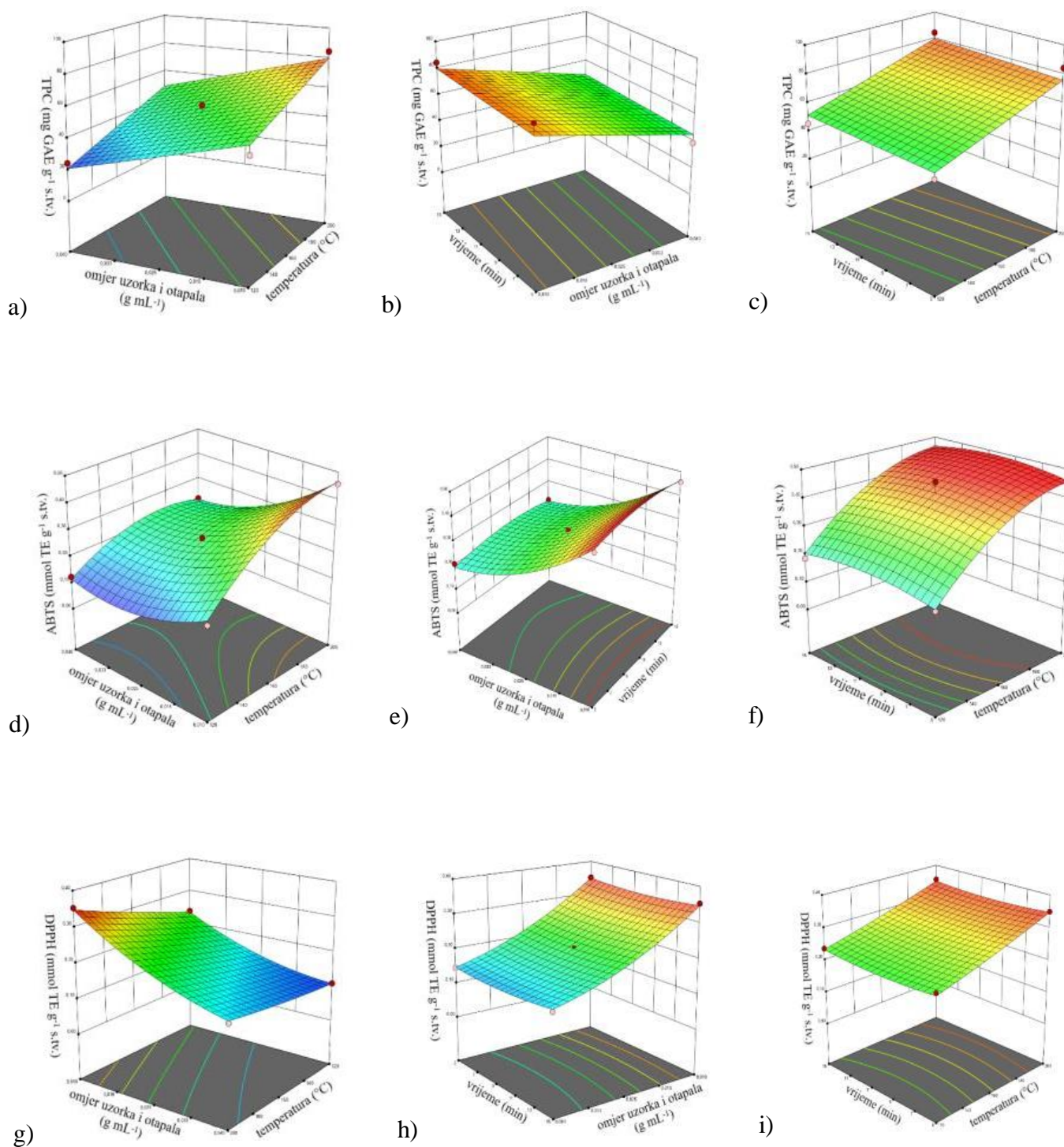
Prethodno navedena opažanja mogu se vizualizirati na trodimenzionalnim prikazima ovisnosti TPC, DPPH ili ABTS odziva o proučavana dva nezavisna parametra (Slika 23a-i). Iz linearno dizajniranog modela za TPC, vidi se linearan učinak povećanja TPC vrijednosti s povećanjem omjera od 1 g : 25 mL do 1 g : 100 mL, kao i postepenim povišenjem temperature od 120 do 200 °C. Kod DPPH odziva je pak izražen kvantitativno izraženiji učinak omjera uzorka i otapala prikazan kvadratnim modelom, za razliku od utjecaja vremena koji djeluje linearno na povećanje DPPH antioksidacijskog kapaciteta od treće do devete minute. Konačno, kod ABTS rezultata jasno se primjećuje najizraženiji pozitivan učinak povišenja temperature sa 120 °C na konačnih 200 °C te povećanja udjela otapala u odnosu na masu uzorka od 1 g : 25 mL do 1 g : 100 mL, na povećanu ekstrakciju spojeva izraženog afiniteta prema „gašenju“ ABTS radikala.

Konačno, definirani su optimalni ekstrakcijski parametri (200 °C, 15 minuta, 1 g : 100 mL) numeričkom optimizacijom svih dobivenih odzivnih vrijednosti u odnosu na provedeni eksperimentalni plan. Može se zaključiti da su eksperimentalne vrijednosti (TPC: 84,50 mg GAE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,353 mmol TE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,458 mmol TE g⁻¹ s. tv.) u skladu s procijenjenim vrijednostima (TPC: 79,91 mg GAE g⁻¹ s. tv., DPPH: 0,348 mmol TE g⁻¹ s. tv., ABTS: 0,450 mmol TE g⁻¹ s. tv.) prema definiranim matematičkim modelima, uz relativne pogreške manje od 10 % (TPC: 5,74 %, DPPH: 1,50 %, ABTS: 1,69 %).

Tablica 37. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za modele SWE tehnike

| TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | |
|--|---|-----------------------|----|-----------------------|---------------|--------------------|
| | Izvor varijabilnosti | SS | df | MS | F-vrijednost | p-vrijednost |
| LINEARNI MODEL | Model | 4388,68 | 3 | 1462,89 | 35,54 | < 0,0001 |
| | Ostatak | 493,98 | 12 | 41,16 | | |
| | Nedostatak modela | 482,02 | 11 | 43,82 | 3,67 | 0,3882 |
| | Čista pogreška | 11,96 | 1 | 11,96 | | |
| | Ukupna korelacija | 4882,66 | 15 | | | |
| | X ₁ :temperatura | 1994,59 | 1 | 1994,59 | 48,45 | < 0,0001 |
| | X ₂ :vrijeme | 36,33 | 1 | 36,33 | 0,8825 | 0,3660 |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 2357,76 | 1 | 2357,76 | 57,28 | < 0,0001 |
| | R ² =0,8988; R ² prilagođen=0,8735; R ² predviđen=0,8050; CV=13,22 %; adek. preciznost=19,5661 | | | | | |
| DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | |
| KVADRATNI MODEL | Model | 0,0901 | 9 | 0,0100 | 81,95 | < 0,0001 |
| | Ostatak | 0,0007 | 6 | 0,0001 | | |
| | Nedostatak modela | 0,0007 | 5 | 0,0001 | 73,12 | 0,0885 |
| | Čista pogreška | 2,00*10 ⁻⁶ | 1 | 2,00*10 ⁻⁶ | | |
| | Ukupna korelacija | 0,0909 | 15 | | | |
| | X ₁ :temperatura | 6,12*10 ⁻⁶ | 1 | 6,12*10 ⁻⁶ | 0,0501 | 0,8303 |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0023 | 1 | 0,0023 | 18,64 | 0,0050 |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,2956 | 0,6062 |
| | X ₁ ² | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,3945 | 0,5531 |
| | X ₂ ² | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 1,86 | 0,2220 |
| | X ₃ ² | 0,0016 | 1 | 0,0016 | 13,24 | 0,0108 |
| R ² =0,9919; R ² prilagođen=0,9798; R ² predviđen=0,9341; CV=5,69 %; adek. preciznost=28,7215 | | | | | | |
| ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | | | | | | |
| KVADRATNI MODEL | Model | 0,1919 | 9 | 0,0213 | 35,02 | 0,0002 |
| | Ostatak | 0,0037 | 6 | 0,0006 | | |
| | Nedostatak modela | 0,0036 | 5 | 0,0007 | 29,62 | 0,1386 |
| | Čista pogreška | 0,0000 | 1 | 0,0000 | | |
| | Ukupna korelacija | 0,1955 | 15 | | | |
| | X ₁ :temperatura | 0,0839 | 1 | 0,0839 | 137,82 | < 0,0001 |
| | X ₂ :vrijeme | 0,0006 | 1 | 0,0006 | 0,9994 | 0,3561 |
| | X ₃ :uzorak:otapalo | 0,0769 | 1 | 0,0769 | 126,34 | < 0,0001 |
| | X ₁ X ₂ | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,0205 | 0,8908 |
| | X ₁ X ₃ | 0,0128 | 1 | 0,0128 | 21,03 | 0,0037 |
| | X ₂ X ₃ | 0,0001 | 1 | 0,0001 | 0,2103 | 0,6627 |
| | X ₁ ² | 0,0104 | 1 | 0,0104 | 17,01 | 0,0062 |
| | X ₂ ² | 0,0017 | 1 | 0,0017 | 2,85 | 0,1421 |
| | X ₃ ² | 0,0088 | 1 | 0,0088 | 14,48 | 0,0089 |
| R ² =0,9813; R ² prilagođen=0,9533; R ² predviđen=0,8412; CV=9,72%; adek. preciznost=19,1837 | | | | | | |

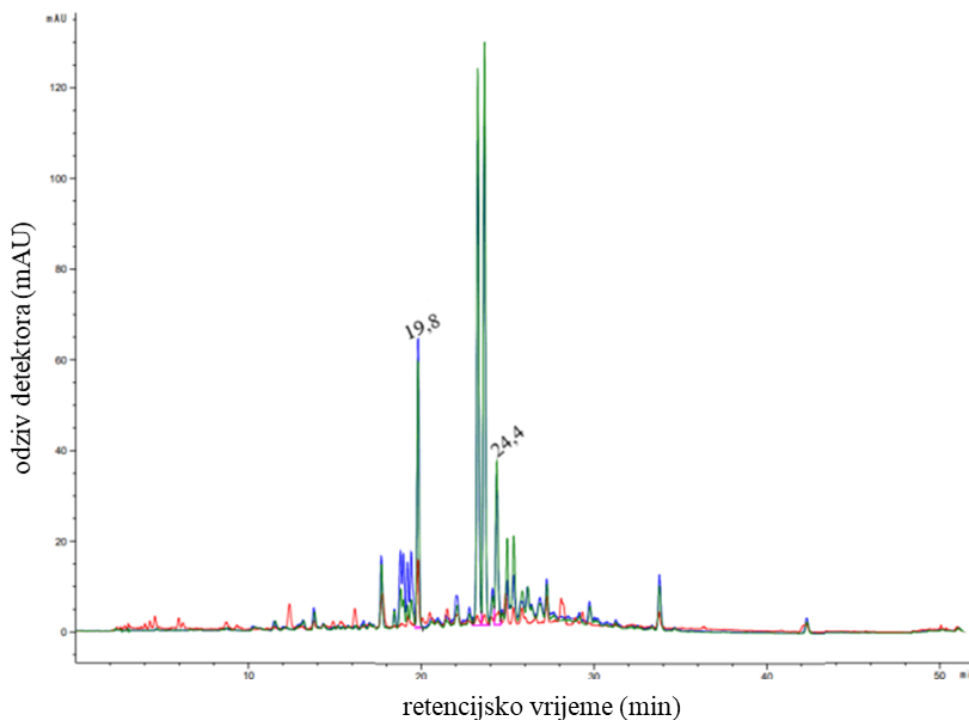
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca. Utjecaj faktora je statistički značajan uz p<0,05.



Slika 23. Trodimenzijski prikazi ovisnosti interakcije nezavisnih varijabli pri uvjetima ekstrakcije subkritičnom vodom o izlaznim varijablama procesa: a-c) udjel ukupnih polifenola (TPC), d-f) antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom i g-i) antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom.

4.2.4. Identifikacija polifenolnih spojeva trave ive

U svrhu definiranja kvalitativnog profila polifenolnih spojeva trave ive, prikupljene sa šest lokaliteta, najprije su pripremljeni vodeni ekstrakti prema prethodno optimiranim uvjetima HAE (100 °C, 30 minuta, 1 g : 100 mL), MAE (90 °C, 9 minuta, 1 g : 100 mL) i SWE (200 °C, 15 minuta, 1 g : 100 mL). Analizom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD), svi uzorci rezultirali su sličnim kromatogramskim profilom. U svim uzorcima pri istim kromatografskim uvjetima detekirani su isti dominantni pikovi. Na Slici 24 prikazan je primjer tri preslikana kromatograma pri valnoj duljini od 320 nm za ekstrakt uzorka T6 dobiven HAE, MAE i SWE ekstrakcijom, a na kojoj se može uočiti da je ekstrakt dobiven pri HAE uvjetima rezultirao najvećim odzivima signala odnosno pikovima pri odabranim eksperimentalnim uvjetima.



Slika 24. Primjer kromatograma polifenolnih ekstrakata trave ive (uzorak TI_6) dobivenih HAE (pikovi označeni zelenom bojom), MAE (pikovi označeni plavom bojom) i SWE (pikovi označeni crvenom bojom) tehnikom.

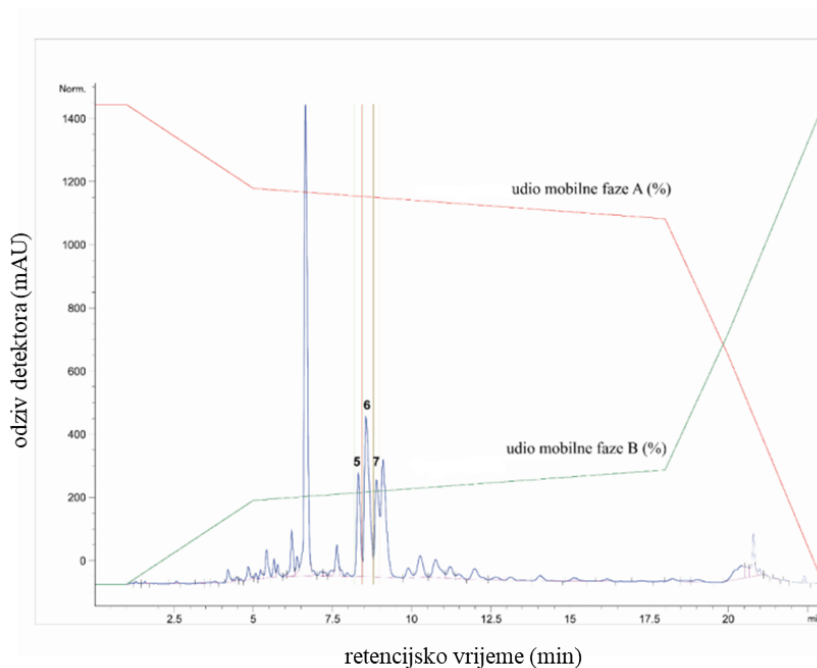
Eluirani spojevi s pripadajućim retencijskim vremenom od 19,8 (ehinakozid) i 24,4 minute (verbaskozid) bili su identificirani usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih

spektara s komercijalno dostupnim standardima, dok se ostali pikovi nisu mogli identificirati na isti način.

4.2.4.1. Analiza spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Prema preliminarnim rezultatima dobivenima primjenom masene spektrometrije s trostrukim kvadrupolom (LC-MS/MS-TQ) spregnute s tekućinskom kromatografijom, kao i usporedbom UV spektara nepoznatih spojeva s prethodno identificiranim ehinakozidom i verbaskozidom, zaključeno je da dominantne frakcije 5, 6 i 7 u svim uzorcima trave ive pripadaju strukturama feniletanoidnih glikozida (na Slici 25 označeni brojevima 5, 6 i 7). Obzirom na kompleksnost kemijske strukture vezane uz prisutnost šećernih komponenata, najprije je pristupljeno kromatografskom izdvajanju polifenolnih frakcija od interesa na preparativnom kromatografu, nakon čega su izolirane polifenolne frakcije uparene i analizirane pomoću NMR spektroskopije.

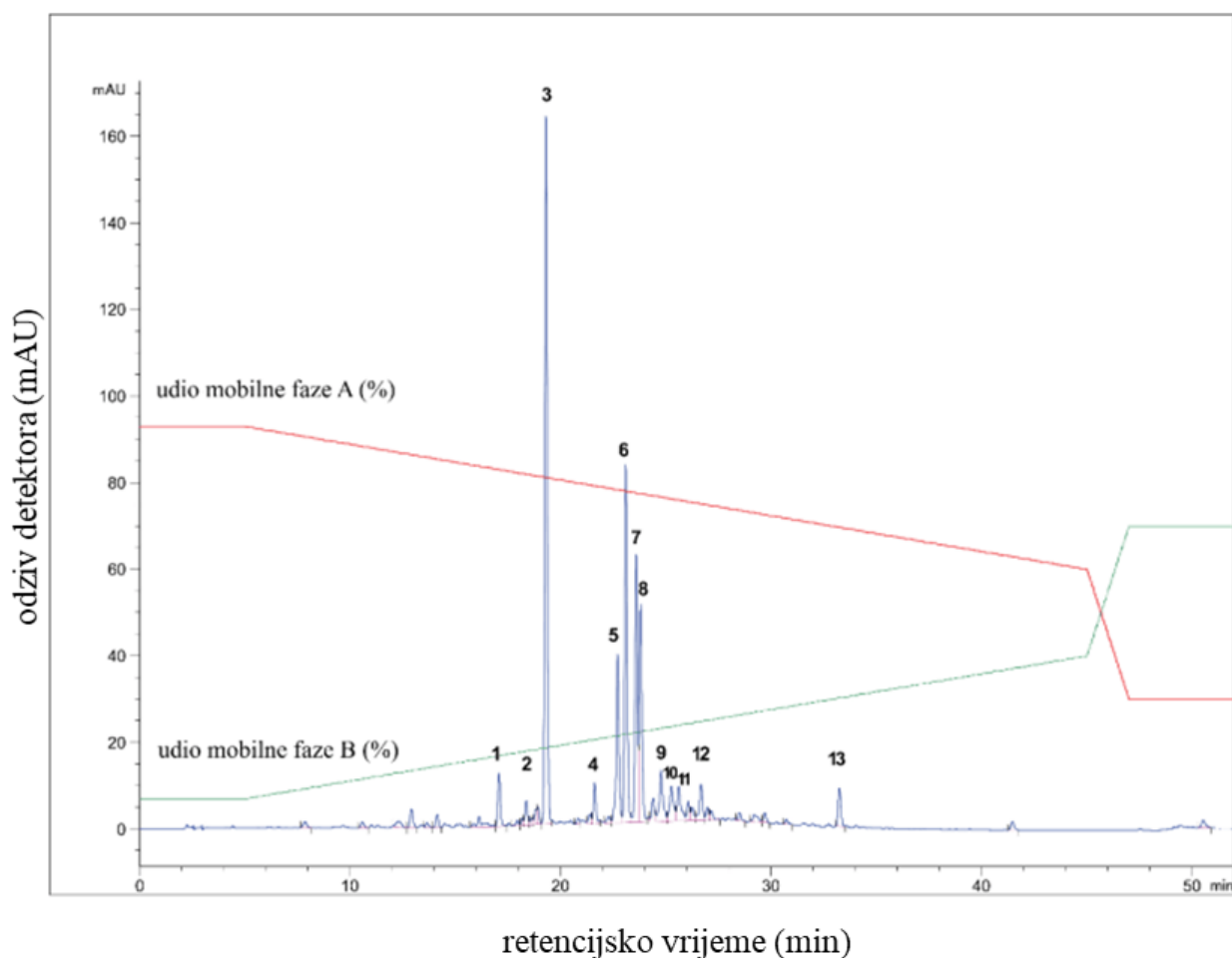
Identificirani su sljedeći feniletanoidni glikozidi: teupoliozid (**5**; eng. *teupolioside*), stahizozid A (**6**; eng. *stachyoside A*) i poliumozid (**7**; *poliumoside*). Svi NMR spektri za analizirane polifenolne frakcije priloženi su u Prilozima (Prilog 1-29.). Eksperimentalno dobiveni podaci priloženi su u Prilogu 30. (rezultati kemijskih pomaka za protone), Prilogu 31. (rezultati kemijskih pomaka za atome ugljika) i Prilogu 32. (rezultati konstanti sprega između protona).



Slika 25. HPLC kromatogram uzorka TI_2 izdvojenih polifenolnih frakcija na preparativnom kromatografu za NMR analizu.

4.2.4.2. Analiza spektrometrijom masa visoke rezolucije spregnutom s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS)

Za identifikaciju ostalih polifenolnih spojeva od interesa prisutnih u HAE, MAE te SWE ekstraktima, kao i proširenje baze podataka za prekursor i fragment ione polifenolnih frakcija identificiranih NMR tehnikom, primijenjena je spektrometrija masa visoke rezolucije korištenjem kvadrupolnog analizatora i analizatora vremena preleta spregnuta s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (u nastavku teksta: UHPLC-HR MS/MS). Samoj analizi prethodilo je izdvajanje polifenolnih frakcija pomoću HPLC-DAD sustava spregnutog s analitičkim sakupljačem frakcija. Ukupno je izdvojeno 13 polifenolnih frakcija, kako je prikazano na Slici 26.



Slika 26. HPLC kromatogram izdvojenih polifenolnih frakcija pomoću analitičkog sakupljača frakcija i analiziranih pomoću UHPLC-HR MS/MS.

Usporedbom dobivenih eksperimentalnih podataka s dostupnom literaturnom bazom podataka, uspješno je identificirano deset polifenolnih frakcija, kako je označeno na Slici 26: PH1, PH2, PH4, PH5, PH6, PH7, PH9, PH10, PH12 i PH13. Premda su prethodno identificirane usporedbom retencijskih vremena s istima analitičkih standarda, frakcije PH3 (ehinakozid) i PH8 (verbaskozid) također su podvrgnute UHPLC-HR MS/MS analizi. Frakcija PH11 ostala je neidentificirana. Analitički standardi ehinakozida i verbaskozida su iskorišteni za optimizaciju uvjeta metode MS/MS analize u negativnom načinu snimanja, a rezultati njihovih fragmentacijskih puteva prikazani su Tablici 38.

Tablica 38. Eksperimentalni podaci za ehinakozid i verbaskozid dobiveni UHPLC-HR MS/MS analizom

| Analitički standard | Molekularna formula | Pogreška (ppm) | Teoretska masa (m/z) | Eksperimentalna masa [M-H] ⁻ (m/z) | MS/MS (m/z) i zastupljenost pojedinog fragmenta (%) |
|---------------------|---|----------------|----------------------|---|--|
| ehinakozid | C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀ | 2,80 | 785,2510 | 785,2532 | MS ² [785,2510]: 623,2200 (2,7), 477,1603 (2,9), 161,0245 (100) |
| verbaskozid | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ | 2,40 | 623,1981 | 623,1996 | MS ² [623,1996]: 461,1665 (7,9), 315,1081 (2,5), 161,0248 (100) |

Prema Tablici 39, među identificiranim polifenolnim spojevima, sedam je feniletanoidnih glikozida: β-OH-forzitozid (Gong i sur., 2016), jionozid A (PH4) (Li i sur., 2015), teupoliozid (PH5) (Zhao i sur., 2020), stahizozid A (PH6) (Yang i sur., 2020), poliumozid (PH7) (Jedjerek i sur., 2020), forzitozid B (PH9) (Li i sur., 2015) i izoverbaskozid (PH10) (Gong i sur., 2016), te tri flavon-glikozida: vicenin-2 (PH1) (Brentan Silva i sur., 2014), diosmin (PH12) (Zhao i sur., 2020) i akacetin-7-*O*-rutinozid (PH13) (Parejo i sur., 2004).

Tablica 39. Eksperimentalni podaci UHPLC-HR MS/MS analize izdvojenih polifenolnih frakcija ekstrakta trave ive

| Frakcija | Rt (min) | Identificirana frakcija | Molekularna formula | Pogreška (ppm) | Teoretska masa prekursor iona (m/z) | Eksperimentalna masa prekursor iona [M-H] ⁻ (m/z) | MS/MS (m/z) i zastupljenost pojedinog fragmenta(%) | Referenca |
|----------|----------|-------------------------------|---|----------------|-------------------------------------|--|---|-----------------------------|
| PH1 | 16,93 | vicenin-2 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 3,37 | 593,1512 | 593,1532 | MS ² [593,1532]: 353,0669 (100), 383,0773 (60,8), 473,1095 (18,5), 325,0716 (10,9), 413,0876 (6,6), 503,1192 (6,4) | Brentan Silva i sur. (2014) |
| PH2 | 18,25 | β-OH-forzitozid B | C ₃₄ H ₄₄ O ₂₀ | 3,37 | 771,2353 | 771,2379 | MS ² [771,2379]: 179,0345 (100), 753,2234 (24,7), 661,1967 (5,3), 591,1925 (13,5) | Gong i sur. (2016) |
| PH4 | 21,47 | jionozid A | C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀ | 3,88 | 799,2666 | 799,2697 | MS ² [799,2697]: 623,2192 (100), 175,0399 (60,9), 477,1604 (5,8), | Li i sur. (2015) |
| PH5 | 22,55 | teupoliozid | C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀ | 1,53 | 785,2510 | 785,2522 | MS ² [785,2522]: 623,2189 (52,3), 161,0241 (100), 477,1609 (2,61), | Zhao i sur. (2020) |
| PH6 | 22,93 | stahizozid A | C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉ | 1,46 | 755,2404 | 755,2415 | MS ² [755,2415]: 161,0244 (100), 593,2097 (42,2), 461,1660 (14,08), 623,1972 (2,5), 315,1078 (2,6) | Yang i sur. (2020) |
| PH7 | 23,43 | poliumozid | C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉ | 2,60 | 769,2561 | 769,2581 | MS ² [769,2581]: 161,0244 (100), 607,2240 (35,1), 461,1649 (3,4), | Jedjerek i sur. (2020) |
| PH9 | 24,59 | forzitozid B | C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉ | 0,66 | 755,2404 | 755,2409 | MS ² [755,2409]: 161,0241 (100), 593,2080 (55,1), 461,1656 (16,4), 623,1980 (6,6), 315,1079 (3,1) | Li i sur. (2015) |
| PH10 | 25,07 | izoverbaskozid | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ | 2,84 | 623,1981 | 623,1999 | MS ² [623,1999]: 161,0249 (100), 113,0242 (16,4), 461,1659 (15,4), 315,1076 (3,4), 251,0551 (1,5) | Gong i sur. (2016) |
| PH11 | 25,42 | / | / | / | / | 635,1993 | MS ² [635,1993]: 455,1345 (100), 309,0977 (97,5), 163,0396 (29,5), 187,0395 (29,5) | / |
| PH12 | 26,48 | diosmin | C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ | 0,00 | 607,1668 | 607,1668 | MS ² [607,1668]: 299,0558 (100), 284,0322 (59,8) | Zhao i sur. (2020) |
| PH13 | 33,02 | akacetin-7-O-rutinozid | C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄ | 3,04 | 591,1719 | 591,1737 | MS ² [591,1737]: 283,0620 (100), 268,0377 (39,0) | Parejo i sur. (2004) |

4.2.5. Polifenolni sastav uzoraka trave ive

U svrhu kvantitativne karakterizacije bioaktivnog potencijala za svih šest biljnih uzoraka trave ive, provedene su konvencionalna ekstrakcija (HAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) prema prethodno optimiranim ekstrakcijskim parametrima temperature, vremena te omjera uzorka i otapala na uzorku TI_5. Svim vodenim ekstraktima trave ive analiziran je udjel TPC-a te antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodom (Singleton i Rossi, 1965; Re i sur., 1999, Brand-Williams i sur., 1995).

Shodno Tablici 40, vidljivo je da je SWE tehnika rezultirala najvećom vrijednosti TPC-a, kao i najizraženijim antioksidacijskim kapacitetom (AK) za sve uzorke trave ive ($p < 0,05$), pri čemu su dobivene vrijednosti bile u rasponu od 84,50-109,55 mg GAE g⁻¹ s. tv., te 0,458-0,547 i 0,353-0,427 mmol TE g⁻¹ s. tv., dok su izmjerene TPC, ABTS i DPPH vrijednosti ekstrakata dobivenih HAE (46,16-71,60 mg GAE g⁻¹ s. tv. te 0,221-0,350 i 0,209-0,338 mmol TE g⁻¹ s. tv) i MAE (46,52-71,80 mg GAE g⁻¹ s. tv., te 0,206-0,329 i 0,171-0,331 mmol TE g⁻¹ s. tv.) tehnikom rezultirale nižim, relativno sličnim ekstrakcijskim prinosom promatranih varijabli ($p > 0,05$), osim kod uzoraka TI_5 te TI_6. Dobiveni rezultati za TPC, ABTS i DPPH međusobno su značajno korelirali unutar primijenjene ekstrakcijske tehnike ($R^2_{HAE}=0,80-0,95$, $R^2_{MAE}=0,70-0,91$, $R^2_{SWE}=0,78-0,93$).

Uzorak TI_6 najviše se istaknuo po udjelu i TPC-a (HAE: 71, 60 mg GAE g⁻¹ s. tv., MAE: 71,80 mg GAE g⁻¹ s. tv., SWE: 109,55 mg GAE g⁻¹ s. tv.) i antioksidacijskim kapacitetom određenim ABTS i DPPH metodama (HAE: 0,350 i 0,338 mmol TE g⁻¹ s. tv., MAE: 0,329 i 0,331 mmol TE g⁻¹ s. tv., SWE: 0,547 i 0,427 mmol TE g⁻¹ s. tv.), dok su svi ostali uzorci rezultirali relativno sličnim udjelima, neovisno o primijenjenoj ekstrakcijskoj tehnici.

Tablica 40. Udjel ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijski kapacitet ekstrakata trave ive

| Ekstrakcijska tehnika | Uzorak | TPC (mg GAE g ⁻¹ s. tv.) | ABTS (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) | DPPH (mmol TE g ⁻¹ s. tv.) |
|-----------------------|--------|--|--|--|
| HAE | | 50,10±0,06 ^a | 0,233±0,00 ^a | 0,209±0,00 ^a |
| MAE | T1 | 46,52±0,74 ^b | 0,206±0,00 ^b | 0,171±0,00 ^a |
| SWE | | 88,55±1,81 ^{ab} | 0,412±0,00 ^{ab} | 0,358±0,01 ^a |
| HAE | | 52,78±1,44 ^a | 0,244±0,01 ^a | 0,230±0,01 ^a |
| MAE | T2 | 47,75±1,13 ^b | 0,219±0,00 ^b | 0,204±0,01 ^b |
| SWE | | 92,36±0,81 ^{ab} | 0,406±0,01 ^{ab} | 0,366±0,00 ^{ab} |
| HAE | | 46,16±0,25 ^a | 0,221±0,00 ^a | 0,209±0,00 ^a |
| MAE | T3 | 48,26±0,06 ^b | 0,218±0,00 ^b | 0,211±0,00 ^b |
| SWE | | 88,98±0,17 ^{ab} | 0,402±0,01 ^{ab} | 0,336±0,00 ^{ab} |
| HAE | | 49,49±0,78 ^a | 0,261±0,01 ^a | 0,231±0,01 ^a |
| MAE | T4 | 47,38±0,82 ^b | 0,223±0,01 ^a | 0,196±0,00 ^a |
| SWE | | 96,18±1,32 ^{ab} | 0,450±0,01 ^a | 0,368±0,00 ^a |
| HAE | | 55,14±0,78 ^a | 0,246±0,00 ^a | 0,292±0,00 ^a |
| MAE | T5 | 48,29±0,35 ^a | 0,265±0,01 ^b | 0,317±0,00 ^b |
| SWE | | 84,50±0,33 ^a | 0,458±0,00 ^{ab} | 0,353±0,00 ^{ab} |
| HAE | | 71,60±1,27 ^a | 0,350±0,01 ^a | 0,338±0,00 ^a |
| MAE | T6 | 71,80±0,82 ^b | 0,329±0,01 ^b | 0,331±0,00 ^b |
| SWE | | 109,55±0,66 ^{ab} | 0,547±0,01 ^{ab} | 0,427±0,00 ^{ab} |

HAE-konvencionalna ekstrakcija; MAE-ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE-ekstrakcija subkritičnom vodom; GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-ekvivalenti Trolox-a. Vrijednosti označene istim slovima unutar istog uzorka u stupcu statistički su značajno različite ($p < 0,05$).

Kvantifikacija identificiranih feniletanoidnih glikozida i flavonoida primjenom analitičkih standarda, UHPLC-HR MS/MS (Q-TOF) tehnike te NMR spektroskopije provedena je putem HPLC-DAD sustava.

Ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid određeni su kao najzastupljeniji polifenolni spojevi u svim HAE, MAE i SWE ekstraktima trave ive (Tablica 41). HAE ekstrakcija pokazala se najučinkovitijom za ekstrakciju feniletanoidnih glikozida iz svih šest uzoraka, s masenim udjelima ukupnih feniletanoidnih glikozida u rasponu od 30,36 do 68,06 mg g⁻¹ s. tv., dok su MAE ekstrakti rezultirali nešto manjim udjelima ($p < 0,05$), između 25,88-58,88 mg g⁻¹ s. tv.

Tablica 41. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u ekstraktima trave ive

| | | mg g ⁻¹ s. tv. | | | | | | | | | | | |
|---------|--------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------|---|
| Tehnika | Uzorak | Vicenin-2 ¹ | β-OH- izoforzitozid 2 | Ehinakozid | Jionozid A ² | Teupoliozid ² | Stahizozid A ² | Poliumozid ² | Verbaskozid | Forzitozid B ² | Izoverbask ozid ³ | Diosmin ⁴ | Akacetin-7- O-rutinozid ⁵ |
| HAE | TI_1 | 0,71 ± 0,03 | 0,57 ± 0,01 | 9,10 ± 0,20 ^a | 1,00 ± 0,04 | 4,23 ± 0,04 | 10,57 ± 0,07 ^a | 1,02 ± 0,02 | 4,42 ± 0,07 ^{ab} | 2,51 ± 0,07 | / | 0,45 ± 0,04 | 0,40 ± 0,01 |
| MAE | | 0,69 ± 0,04 | 0,78 ± 0,05 | 6,33 ± 0,41 ^a | 1,09 ± 0,03 | 3,03 ± 0,17 | 5,59 ± 0,04 ^a | 0,78 ± 0,01 | 2,78 ± 0,01 ^a | 0,94 ± 0,12 | / | 0,39 ± 0,00 | 0,37 ± 0,03 |
| SWE | | / | / | 2,94 ± 0,71 ^a | 1,40 ± 0,55 | / | 1,06 ± 0,49 ^a | / | 1,61 ± 0,60 ^b | 2,12 ± 1,34 | 2,09 ± 0,91 | / | / |
| HAE | TI_2 | 0,58 ± 0,03 ^a | 0,85 ± 0,03 | 23,54 ± 1,10 ^a | 1,48 ± 0,10 | 6,93 ± 0,42 ^a | 13,39 [±] _{ab} 0,83 | 9,14 ± 0,39 ^a | 7,90 ± 0,46 ^a | 2,82 ± 0,33 | 2,01 ± 0,24 | 0,55 ± 0,10 | 0,37 ± 0,02 |
| MAE | | 0,27 ± 0,02 ^a | 1,44 ± 0,09 | 11,94 ± 0,08 ^a | 1,48 ± 0,04 | 4,67 ± 0,04 ^b | 0,69 ± 0,01 ^a | 7,55 ± 0,24 ^a | 3,72 ± 0,06 ^a | / | 1,28 ± 0,07 | 0,38 ± 0,07 | 0,17 ± 0,01 |
| SWE | | / | / | 3,97 ± 0,11 ^a | 1,20 ± 0,20 | 1,22 ± 0,63 ^{ab} | 0,87 ± 0,11 ^b | 1,89 ± 0,08 ^a | 0,96 ± 0,07 ^a | 0,45 ± 0,09 | 1,04 ± 0,07 | 0,43 ± 0,02 | / |
| HAE | TI_3 | / | / | 0,69 ± 0,05 | / | 2,08 ± 0,02 | 1,91 ± 0,06 | 21,72 ± 0,22 ^a | 3,13 ± 0,06 ^a | / | 0,83 ± 0,15 | 0,39 ± 0,01 | / |
| MAE | | / | / | 1,81 ± 0,29 | / | 2,71 ± 0,06 | 1,90 ± 0,01 | 24,55 ± 0,76 ^a | 3,20 ± 0,09 ^b | / | / | 0,53 ± 0,02 | / |
| SWE | | / | / | / | / | / | 1,20 ± 0,05 | 4,33 ± 0,13 ^a | 1,06 ± 0,05 ^{ab} | / | 1,29 ± 0,06 | 0,33 ± 0,02 | / |
| HAE | TI_4 | 0,36 ± 0,01 | 1,01 ± 0,01 ^a | 6,66 ± 0,08 ^b | 0,77 ± 0,02 | 19,56 ± 0,70 ^a | 8,02 ± 0,18 ^a | 0,63 ± 0,01 | 3,35 ± 0,08 ^a | 1,33 ± 0,00 | / | 0,44 ± 0,02 | / |
| MAE | | 0,34 ± 0,00 | 3,08 ± 0,44 ^a | 5,48 ± 0,22 ^a | 1,75 ± 0,12 | 8,79 ± 1,51 ^a | 3,55 ± 0,63 ^a | 0,80 ± 0,01 | 1,87 ± 0,23 ^a | / | 0,56 ± 0,09 | 0,53 ± 0,10 | / |
| SWE | | / | / | 1,95 ± 0,03 ^{ab} | 1,35 ± 0,06 | / | / | / | / | / | 1,32 ± 0,08 | 0,61 ± 0,02 | / |
| HAE | TI_5 | 0,57 ± 0,02 ^a | 0,61 ± 0,28 | 8,90 ± 0,22 ^b | 0,83 ± 0,06 | 4,60 ± 0,12 | 8,89 ± 0,13 ^a | 0,59 ± 0,01 | 6,28 ± 0,10 ^a | 1,58 ± 0,03 | 1,09 ± 0,05 | 0,37 ± 0,07 | 0,15 ± 0,02 |
| MAE | | 0,70 ± 0,00 ^a | / | 9,43 ± 0,06 ^a | 1,19 ± 0,02 | 3,49 ± 0,02 | 5,26 ± 0,15 ^a | 0,74 ± 0,03 | 4,31 ± 0,07 ^a | 0,94 ± 0,01 | 0,55 ± 0,01 | 0,42 ± 0,08 | 0,16 ± 0,00 |
| SWE | | / | / | 2,94 ± 0,27 ^{ab} | / | / | / | / | / | 1,84 ± 0,05 ^a | / | / | / |
| HAE | TI_6 | 0,70 ± 0,01 | 1,43 ± 0,01 ^a | 8,57 ± 0,21 ^b | 0,97 ± 0,03 | 21,02 ± 0,86 ^a | 21,33 ± 0,78 ^a | 1,06 ± 0,03 | 6,00 ± 0,19 | 3,66 ± 0,05 | 1,84 ± 0,06 | 0,45 ± 0,03 | 0,46 ± 0,02 |
| MAE | | 0,75 ± 0,01 | 2,66 ± 0,01 ^a | 8,78 ± 0,00 ^a | 1,72 ± 0,11 | 17,39 ± 0,04 ^a | 17,55 ± 0,17 ^a | 1,20 ± 0,19 | 5,50 ± 0,20 | 2,61 ± 0,10 | 1,47 ± 0,16 | 0,58 ± 0,01 | 0,54 ± 0,00 |
| SWE | | / | / | 3,10 ± 0,91 ^{ab} | 1,44 ± 0,70 | 1,28 ± 0,76 ^a | / | / | / | / | 2,16 ± 1,10 | 0,66 ± 0,26 | / |

HAE-konvencionalna ekstrakcija; MAE-ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE-ekstrakcija subkritičnom vodom; ¹ kvantificirano u ekvivalentima apigenina; ² kvantificirano u ekvivalentima ehinakozida; ³ kvantificirano u ekvivalentima verbaskozida; ⁴ kvantificirano u ekvivalentima diosmetina; ⁵ kvantificirano u ekvivalentima akacetina. Vrijednosti označene istim slovima unutar istog uzorka u stupcu su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

S druge strane, najmanji udjel ukupnih feniletanoidnih glikozida kvantificiran je u svim SWE ekstraktima trave ive (4,62 do 21,32 mg g⁻¹). U ovom istraživanju, β-OH-forzitozid B, jionozid A, teupoliozid i stahizozid A identificirani su po prvi put u travi ivi. Uzimajući u obzir udjele pojedinačnih feniletanoidnih glikozida u uzorcima s različitih lokaliteta, može se zaključiti da HAE ekstrakte uzoraka TI_2, TI_3 i TI_4 karakterizira vrlo visoki udjel ehinakozida (23,54 mg g⁻¹ s. tv.), poliumozida (21,72 mg g⁻¹ s. tv.) i teupoliozida (19,56 mg g⁻¹ dw), dok je u HAE ekstraktu uzorka T6 određen visoki udjel teupoliozida (21,02 mg g⁻¹ s. tv.) i stahizozida A (21,33 mg g⁻¹ s. tv.).

Premda se prema dostupnoj literaturi flavonoidi često ističu kao dominantni u *Teucrium* vrstama, u ovom istraživanju identificirana su samo tri flavonoida u HAE i MAE ekstraktima trave ive: vicenin-2 (apigenin-6,8-*C*-di-*C*-glukopiranozid), diosmin (diosmetin-7-*O*-rutinozid), i akacetin-7-*O*-rutinozid u značajno manjim udjelima od prethodno spomenutih feniletanoidnih glikozida. Vicenin-2 kvantificiran je u udjelu od 0,36-0,70 mg g⁻¹ s. tv. i 0,27-0,75 mg g⁻¹ s. tv. u HAE, odnosno MAE ekstraktima. Diosmin (HAE: 0,37-0,55 mg g⁻¹ s. tv., MAE: 0,33-0,58 mg g⁻¹ s. tv.) i akacetin-7-*O*-rutinozid (HAE: 0,15-0,46 mg g⁻¹ s. tv., MAE: 0,16-0,54 mg g⁻¹ s. tv.) također su detektirani u sličnim udjelima. U SWE ekstraktima nije određen značajan udjel flavonoida, obzirom da je vicenin-2 identificiran tek ispod limita detekcije, dok je diosmin identificiran u uzorcima TI_2, TI_3, TI_4 i TI_6 u rasponu od 0,33-0,66 mg g⁻¹ s. tv., a akacetin-7-*O*-rutinozid samo u uzorku TI_5 (0,27 mg g⁻¹ s. tv.).

4.3. *In vitro* biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive

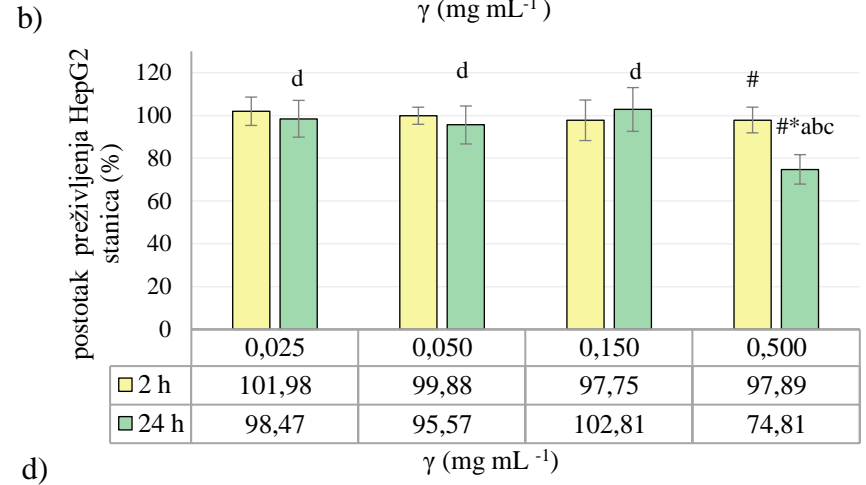
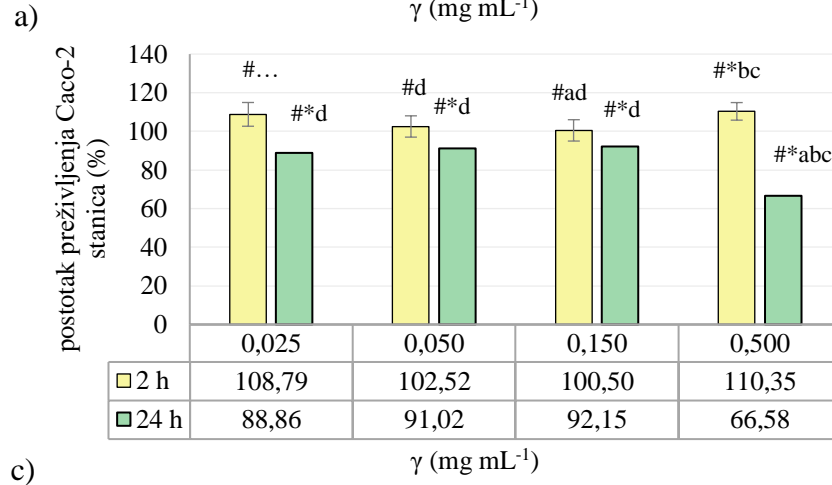
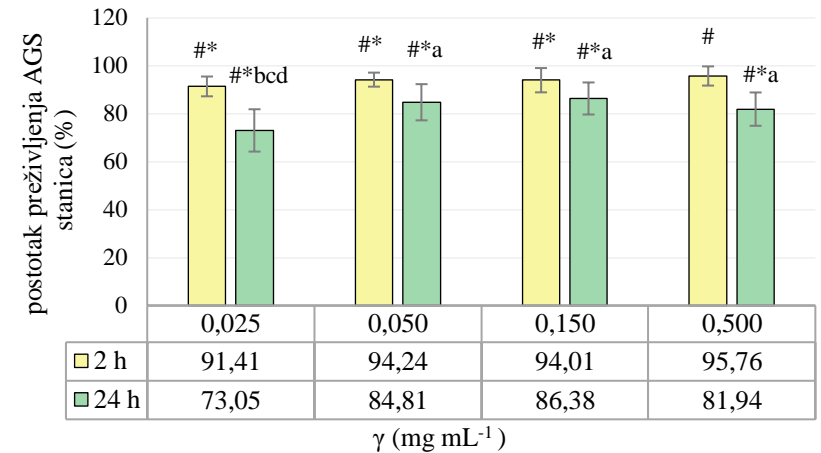
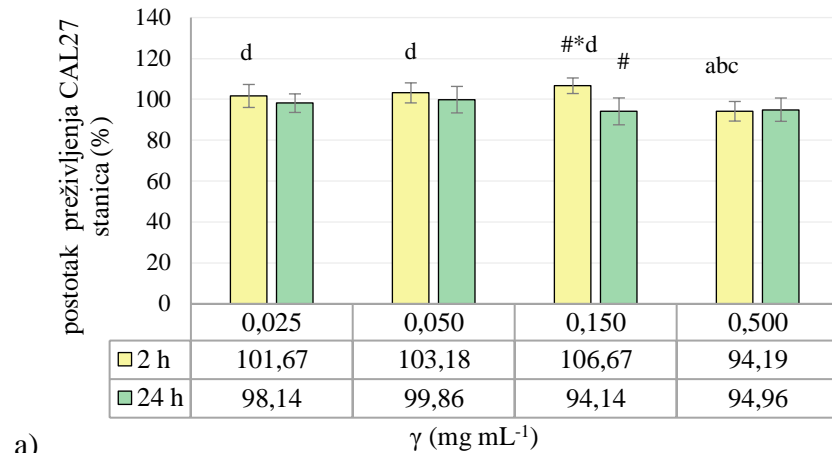
Rezultati kvalitativne i kvantitativne karakterizacije pomoću NMR spektroskopije, UHPLC-HR MS/MS te HPLC-DAD analize poslužili su kao glavna smjernica za odabir uzorka trave ive, kao i ekstrakcijske tehnike, za daljnje analize. Uzimajući u obzir najveći udjel feniletanoidnih glikozida (6,1 % na masu s. tv. početnog biljnog materijala), uzorak TI_2 sakupljen na području Šibensko-kninske županije (Općina Varivode) odabran je za nastavak cjelokupnog eksperimentalnog istraživanja, uključujući i *in vitro* analize. Najprije je pripremljen liofilizirani ekstrakt trave ive prema HAE optimiranim ekstrakcijskim uvjetima (potpoglavlje 4.2.1.) te su pripremljene odvage mase liofilizata prema prethodno definiranim koncentracijama ekstrakta (0,025, 0,050, 0,150 i 0,500 mg mL⁻¹), a pri čemu je masena koncentracija od 0,050 mg mL⁻¹ (dnevna doza računata na 200 mL unešenog biljnog dekokta) poslužila kao referentna koncentracija za izračun ostalih.

Obzirom da probavni organi sudjeluju u samom početku provođenja metaboličkih procesa bilo koje istraživane komponente ili matriksa hrane u organizmu, kao i ishodišnoj biokemijskoj transformaciji promatranih spojeva u njihove metabolite, određen je citotoksični/proliferativni, prooksidacijski/antioksidacijski te genotoksični/genoprotektivni učinak ekstrakta trave ive na stanične linije karcinoma epitela jezika (CAL27), želuca (AGS), debelog crijeva (Caco-2) i jetre (HepG2). Za genotoksični/genoprotektivni učinak je, uz prethodno spomenute humane stanične linije probavnog sustava i jetre, korištena i modelna stanična makromolekula DNK. Dodatno, ispitan je i citotoksični/proliferativni učinak liofiliziranog ekstrakta trave ive na odabrane predstavnike humane mikrobiote.

4.3.1. Citotoksični/proliferativni učinak na kontinuirane humane stanične linije

U istraživanju su korištene kontinuirane humane stanične linije probavnog sustava i jetre: epitelni karcinom jezika (CAL27; ATCC CRL-2095), i adenokarcinom želuca (AGS, ATCC CRL-1739), epitelni kolorektalni adenokarcinom (Caco-2; ATCC HTB-37) i hepatocelularni karcinom (HepG2; ATCC HB-8065).

Prema dobivenim rezultatima za CAL27 stanice (Slika 27a) tretiranih ekstraktom, ni jedna od ispitivanih koncentracija nije pokazala statistički značajan ($p > 0,05$) proliferativni učinak nakon 2 i 24 sata tretmana, u odnosu na negativnu kontrolu, osim koncentracije ekstrakta od $0,150 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) (106,7 %). Prema Slici 27b, može se uočiti statistički značajan ($p < 0,05$) citotoksični učinak ovisan i o koncentraciji ekstrakta i vremenu tretmana na AGS stanice, u odnosu na negativnu kontrolu, isključujući tretman najvećom koncentracijom ($0,500 \text{ mg mL}^{-1}$) nakon 2 sata ($p > 0,05$). Na ispitanim Caco-2 stanicama također je uočen statistički značajan ($p < 0,05$), o koncentraciji i vremenu, ovisan učinak ekstrakta. Nakon 2 sata tretmana, primijećen je statistički značajan ($p < 0,05$) proliferativni učinak najmanje ($0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) i najveće koncentracije ($0,500 \text{ mg mL}^{-1}$) u odnosu na kontrolu (Slika 27c). Suprotno rezultatima pri tretmanu od 2 sata, izlaganje Caco-2 stanica ekstraktu tijekom 24 sata uzrokovalo je statistički značajan citotoksični učinak ($p < 0,05$) svih testiranih koncentracija u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati na Slici 27d ukazuju da nije bilo statistički značajnog citotoksičnog učinka ($p > 0,05$) prilikom tretmana ekstraktom na HepG2 stanice, izuzev koncentracije od $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$, a koja je rezultirala statistički značajnim ($p < 0,05$) citotoksičnim djelovanjem nakon 24 sata, i u odnosu na kontrolu i na sve tri, niže primijenjene koncentracije i na kraće vremensko izlaganje (2 sata).



*= statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,050 mg mL⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,150 mg mL⁻¹; d=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,500 mg mL⁻¹. Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey posthoc test. Vrijednosti označene sa znakom # su statistički značajno ($p < 0,05$) različite obzirom na vrijeme tretmana za svaku koncentraciju ekstrakta, a dobivene su provedbom Mann-Whitney testa.

Slika 27. Preživljenje staničnih linija: a) CAL27, b) AGS, c) Caco-2 i d) HepG2 ovisno o primijenjenoj koncentraciji ekstrakta trave ive u vremenskom tretmanu od 2 i 24 sata.

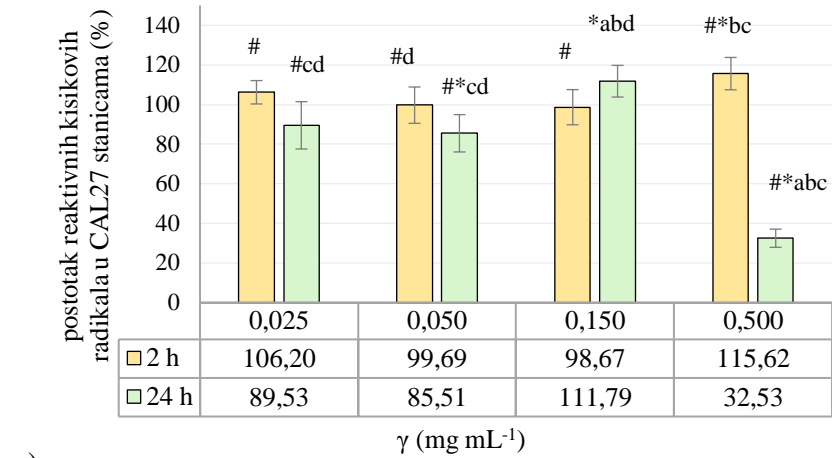
4.3.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak na kontinuirane humane stanične linije

Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka ekstrakta trave ive na odabrane (adeno) karcinome humanih staničnih linija probavnog sustava u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 sata, korištena je DCFH-DA metoda, a rezultati su izraženi kao postotak reaktivnih kisikovih radikala (%), tj. ROS-ova u odnosu na negativnu kontrolu (100 %).

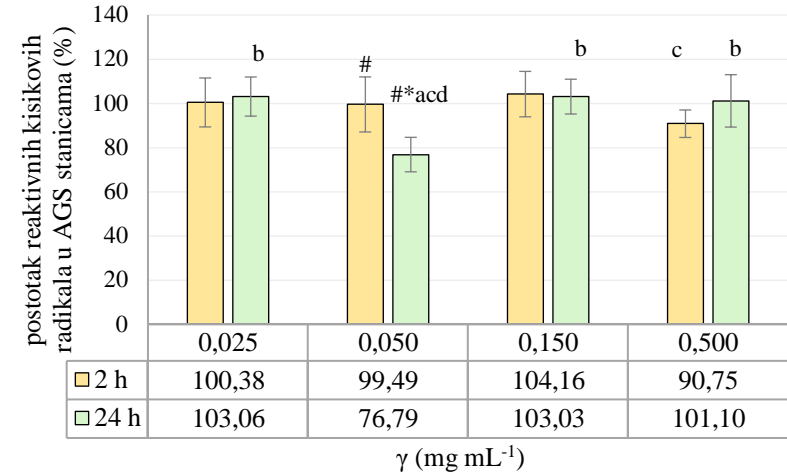
Statistički značajno različit ($p < 0,05$), dozno i vremenski ovisan odgovor CAL27 stanica na tretman biljnim ekstraktom, vidljiv je na Slici 28a. Nakon 2 sata tretmana, statistički značajan ($p < 0,05$) prooksidacijski učinak ekstrakta vidljiv je samo pri koncentraciji od $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu. Statistički značajan ($p < 0,05$) antioksidacijski učinak ekstrakta tijekom prolongiranog tretmana (24 sata) vidljiv je pri $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu. Kod tretiranih AGS stanica (Slika 28b), nije primijećena statistički značajna ($p > 0,05$) indukcija ROS-ova nakon 2 sata unutar cjelokupnog raspona koncentracija ekstrakta u odnosu na kontrolu. Tijekom dulje izloženosti stanica (24 sata), detektiran je statistički značajan ($p < 0,05$) antioksidacijski učinak, i vremena tretmana i koncentracije ekstrakta od $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$, u odnosu na kontrolu i sve ostale primijenjene koncentracije.

U slučaju izlaganja Caco-2 stanica (Slika 28c), indukcija ROS-ova pri dvosatnom izlaganju je statistički značajno smanjena ($p < 0,05$) tretmanom ekstrakta koncentracijama od $0,050$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$. Nakon 24 sata izloženosti ekstraktu, trend statistički značajnog učinka ($p < 0,05$) i ekstrakta i produljenog vremena izlaganja, na smanjenje generiranja ROS-ova nastavio se samo pri koncentraciji ekstrakta od $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu, dok je kod $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ uočen suprotan, tj. statistički značajan prooksidacijski učinak ($p < 0,05$), ali samo u odnosu na sve ostale koncentracije.

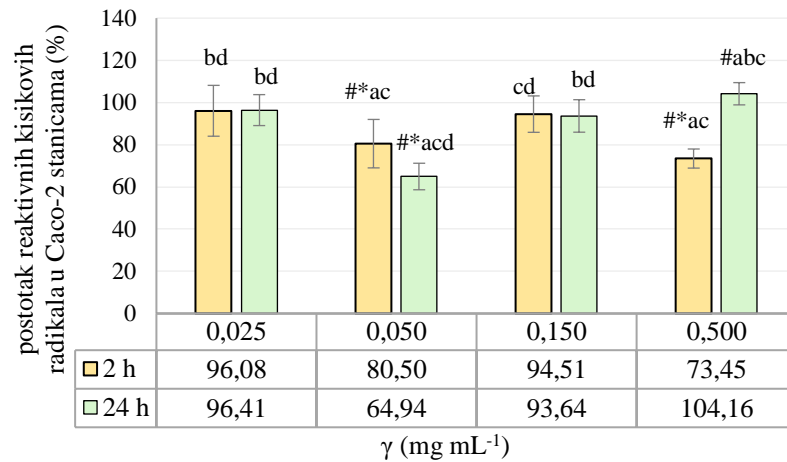
Statistički značajno ($p < 0,05$) antioksidacijsko djelovanje ekstrakta uočeno je i kod HepG2 stanica nakon 2 sata, i to pri najnižoj koncentraciji (28d). Nakon 24 sata, detektirano je statistički značajno ($p < 0,05$) antioksidacijsko djelovanje unutar cijelog koncentracijskog raspona ekstrakta te povećanjem vremena tretmana, pri čemu su $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ pokazale statistički značajan učinak na smanjenje indukcije ROS-ova za čak 55-60 % ($p < 0,05$).



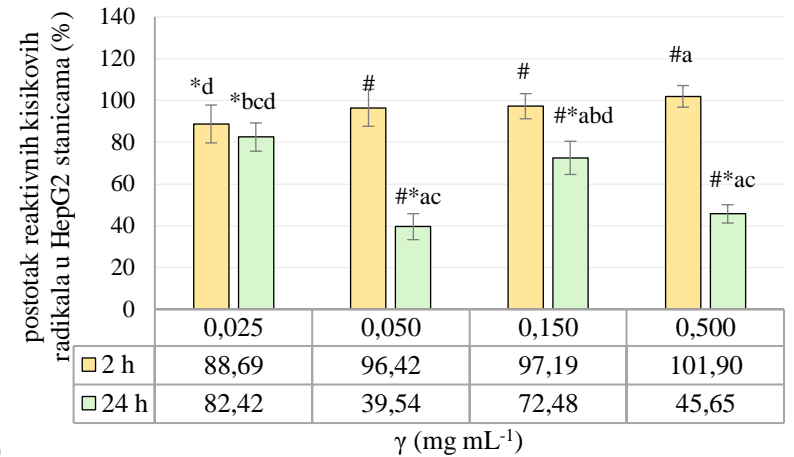
a)



b)



c)



d)

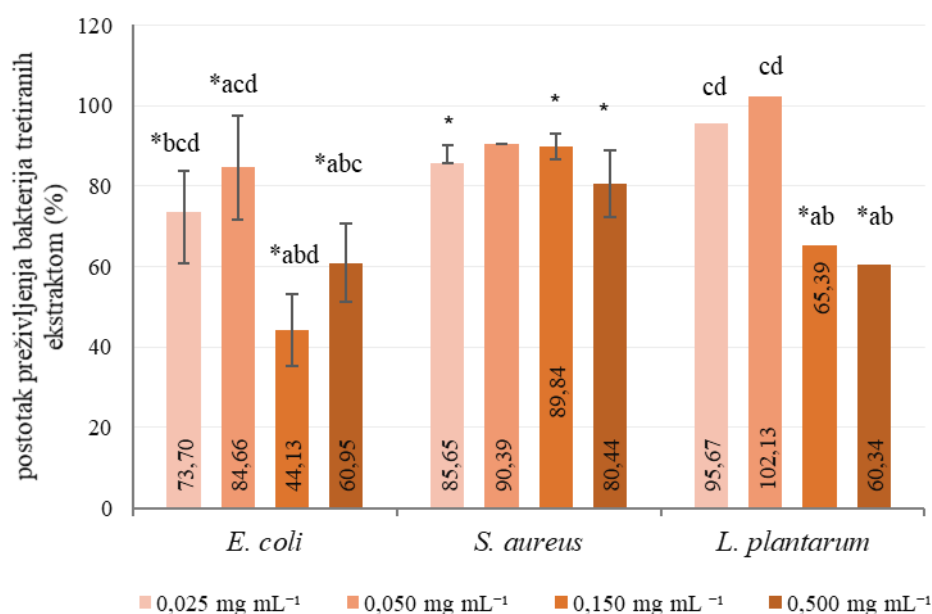
*= statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,050 mg mL⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,150 mg mL⁻¹; d=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,500 mg mL⁻¹. Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey posthoc test. Vrijednosti označene sa znakom # su statistički značajno ($p < 0,05$) različite obzirom na vrijeme tretmana za svaku koncentraciju ekstrakta, a dobivene su provedbom Mann-Whitney testa.

Slika 28. Indukcija slobodnih radikala na staničnim linijama: a) CAL27 b) AGS, c) Caco-2 i d) HepG2 ovisno o primijenjenoj koncentraciji ekstrakta trave ive u vremenskom tretmanu od 2 i 24 sata.

4.3.3. Bakteriostatski/proliferativni učinak na predstavnike humane mikrobiote

Nakon 60-minutnog tretmana definiranim koncentracijama ekstrakta, nacjepljivanja i 24-satne inkubacije Gram-pozitivnih (*S. aureus* i *L. plantarum*) te Gram-negativne bakterije (*E. coli*) kao važnih predstavnika humane mikrobiote, određen je postotak preživljenja bakterija (%) u odnosu na negativnu kontrolu (100 %) (Slika 29).

Primijećen je statistički značajan ($p < 0,05$) bakteriostatski učinak svih koncentracija ekstrakta na *E. coli* u odnosu na kontrolu. Uočen je i statistički značajan ($p < 0,05$) bakteriostatski učinak primijenjenih koncentracija od 0,025, 0,150 i 0,500 mg mL⁻¹ ekstrakta na *S. aureus* u odnosu na kontrolu. S druge strane, primijenjene koncentracije ekstrakta od 0,150 te 0,500 mg mL⁻¹ rezultirale su statistički značajnim ($p < 0,05$) smanjenom vijabilnosti stanica bakterije *L. plantarum* u odnosu na kontrolu, ali i na niže ispitivane koncentracije.



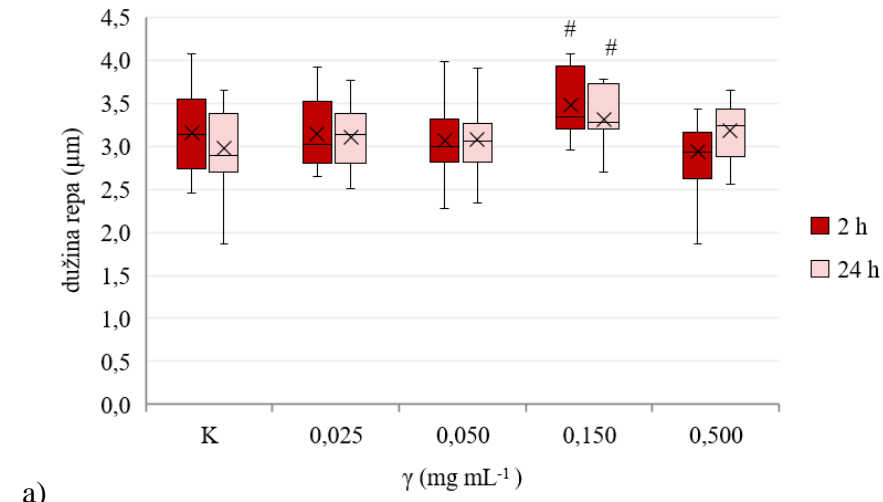
*= statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,050 mg mL⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,150 mg mL⁻¹; d=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,500 mg mL⁻¹. Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey posthoc test.

Slika 29. Preživljenje ispitivanih bakterijskih kultura tretiranih ekstraktom trave ive.

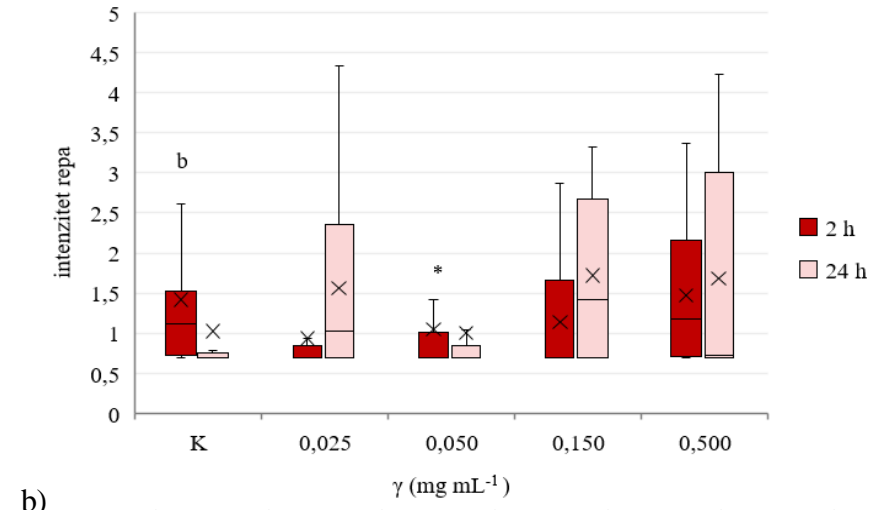
4.3.4. Genotoksični/genoprotektivni učinak na kontinuirane humane stanične linije i modelnu DNK

Za procjenu utjecaja ekstrakta na oksidacijsko oštećenje genetičkog materijala odabranih staničnih linija, odnosno modelne makromolekule DNK, analizirani su odabrani parametri komet testa-dužina repa i intenzitet repa kao indikatori veličine, odnosno stupnja oštećenja.

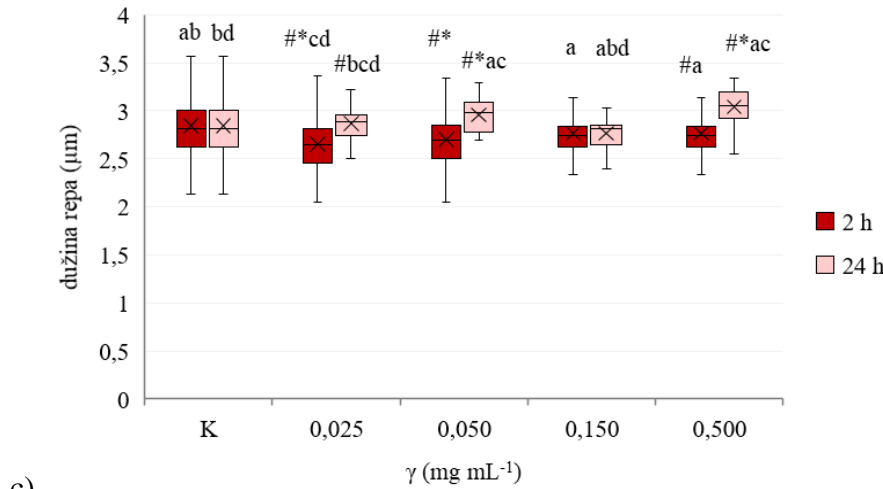
Obzirom na oba izmjerena parametra u odnosu na kontrolu, gotovo sve testirane koncentracije ekstrakta nisu pokazale statistički značajan ($p > 0,05$) utjecaj na genetički materijal promatranih CAL27 stanica, osim koncentracije od $0,150 \text{ mg mL}^{-1}$ koja je pokazala statistički značajan ($p < 0,05$) učinak ovisan o vremenu tretmana kod parametra dužine repa i koncentracije od $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ koja je pokazala statistički značajan ($p < 0,05$) učinak u odnosu na kontrolu kod parametra intenziteta repa (Slika 30a-b). Uzimajući u obzir statistički značajno smanjenje dužine repa ($p < 0,05$), moguće je govoriti o potencijalnom genoprotektivnom učinku nakon 2 sata tretmana pri koncentracijama od $0,025$ i $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ kod AGS stanica u odnosu na kontrolu (Slika 30c). Nakon prolongiranog izlaganja (24 sata), vidljiv je pak statistički značajan ($p < 0,05$) genotoksični učinak pri koncentracijama od $0,050$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu. S druge strane, nije izmjeren statistički značajan ($p > 0,05$) učinak niti jedne koncentracije ekstrakta na promjenu intenziteta repa u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Kod Caco-2 stanica, statistički značajno povećanje dužine repa ($p < 0,05$) određeno je nakon 2 sata tretmana primjenom koncentracije $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu, dok statistički značajan ($p > 0,05$) učinak ekstrakta na promjene u intenzitetu repa nije uočen niti pri jednoj koncentraciji, kao ni nakon prolongiranog tretmana od 24 sata (Slika 30e-f). S druge strane, vrijeme tretmana se pokazalo statistički značajnim ($p < 0,05$) za smanjenje dužine repa kod koncentracija od $0,025$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$, dok se intenzitet repa statistički značajno ($p < 0,05$) povećao produljenjem tretmana kod koncentracija $0,150$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$. Prilikom tretiranja HepG2 stanica, koncentracije $0,050$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ pokazale su statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje dužine repa u odnosu na kontrolu nakon 2 sata (Slika 30g-h). Nakon 24 sata tretmana, vidljivo je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje količine oštećenja primjenom koncentracija od $0,050$ i $0,150 \text{ mg mL}^{-1}$ u odnosu na kontrolu, dok se vrijeme tretmana pokazalo statistički značajnim ($p < 0,05$) u smanjenju intenziteta repa pri najvišoj koncentraciji ekstrakta.



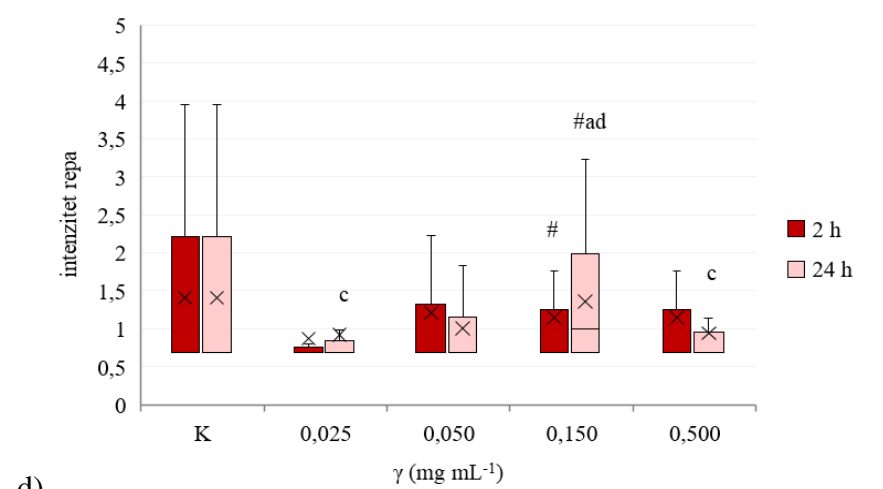
a)



b)

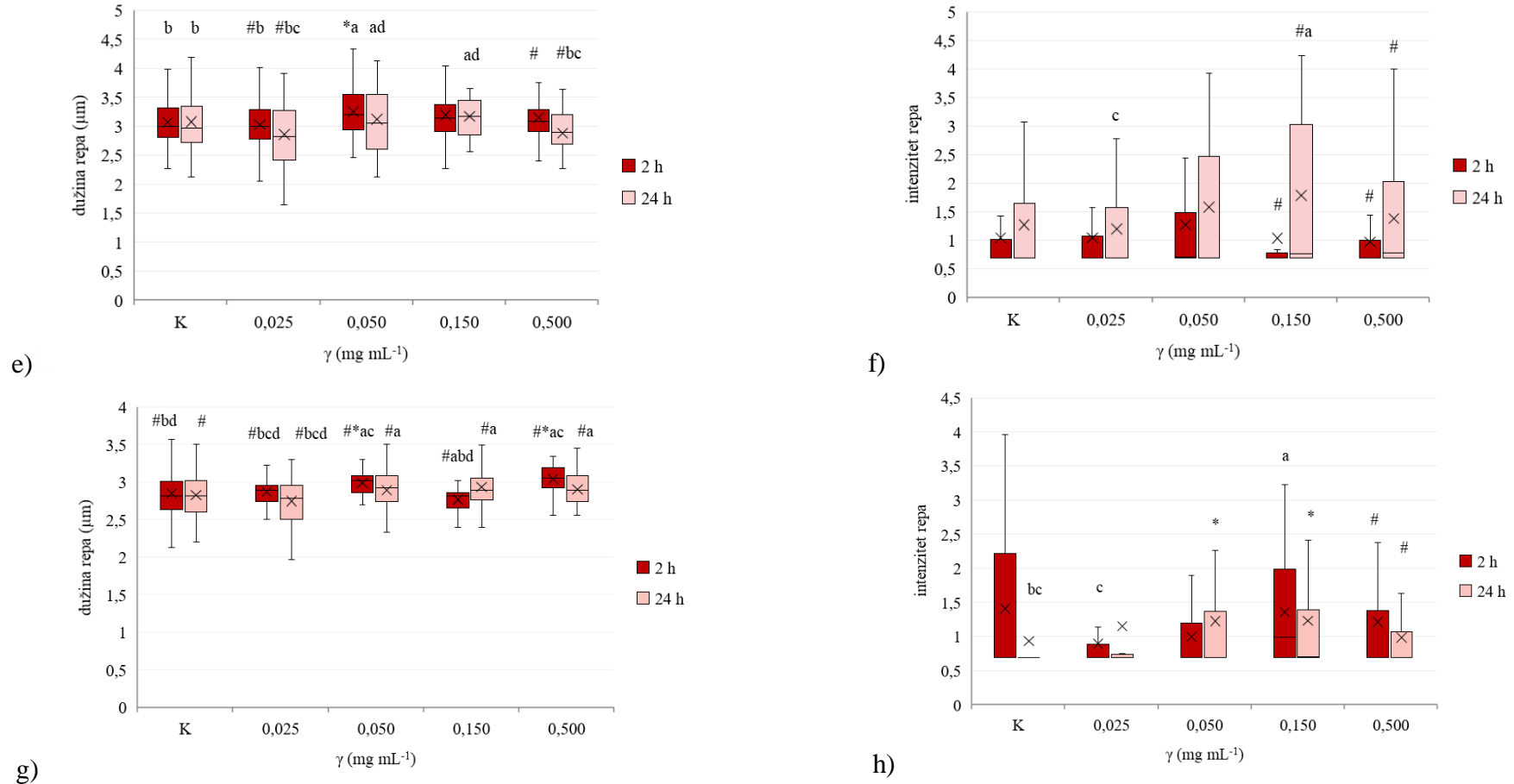


c)



d)

Slika 30

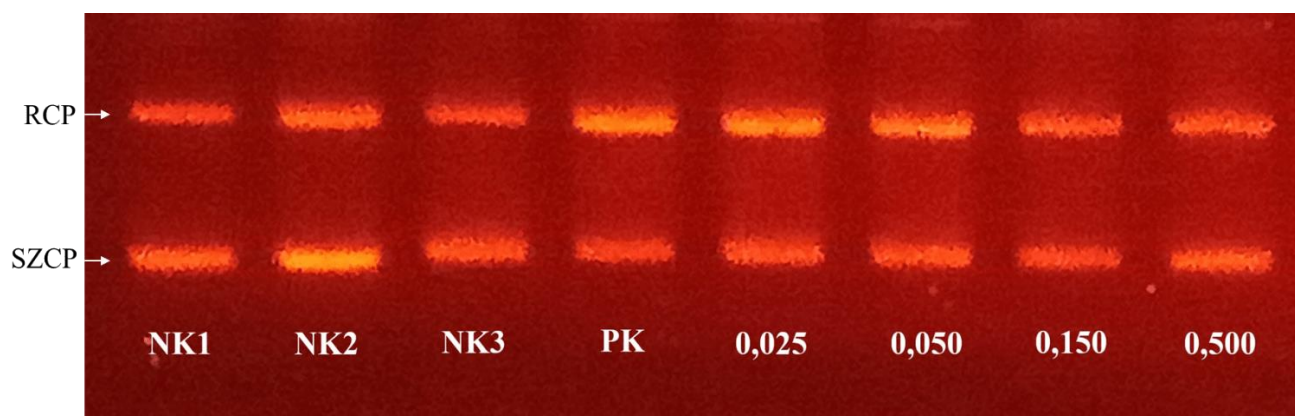


*= statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,050 mg mL⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,150 mg mL⁻¹; d=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,500 mg mL⁻¹. Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey posthoc test. Vrijednosti označene sa znakom # su statistički značajno ($p < 0,05$) različite obzirom na vrijeme tretmana za svaku koncentraciju ekstrakta, a dobivene su provedbom Mann-Whitney testa.

Slika 30. Utjecaj ekstrakta trave ive na dužinu i intenzitet repa u staničnim linijama: a-b) CAL27, c-d) AGS, e-f) Caco-2 i g-h) HepG2 stanicama ovisno o primijenjenoj koncentraciji ekstrakta trave ive u vremenskom tretmanu od 2 i 24 sata.

Genoprotektivni/genotoksični učinak ekstrakta trave ive u definiranom rasponu koncentracija ispitan je na modelnom plazmidu phiX174 RF1 DNA. Na Slici 31, prikazana je slika gela s detektiranim vrpcama relaksirane (RCP) i superzavijene forme (SZCP) cirkularne DNK nakon tretmana plazmida ekstraktom u definiranom koncentracijskom rasponu uz fotolizu H₂O₂ potaknutu UV zračenjem, dok su obradom dobivenih slika nakon gel elektroforeze (program GelAnalyzer) izračunati omjeri SZCP i RCP forme. (Slika 32).

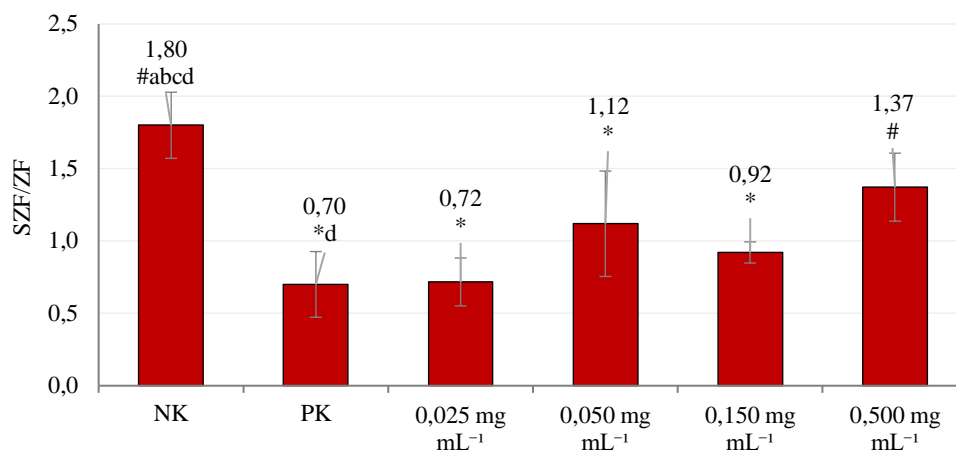
Ustanovljena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu kod svih primijenjenih koncentracija, osim kod 0,500 mg mL⁻¹. Potencijalno genoprotektivno djelovanje prilikom tretmana modelnog plazmida najvećom koncentracijom ekstrakta potvrđeno je obzirom na statistički značajno veći udjel sadržane SZCRP forme naspram RCP, a u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p < 0,05$).



RCP: relaksirana cirkularna forma plazmida; **SZCP:** superzavijena cirkularna forma plazmida; **NK1:** plazmid + pufer; **NK2:** H₂O₂; **NK3:** UV zračenje; **PK-**plazmid + puferH₂O₂ + UV zračenje); **0,025-0,500:** koncentracije ekstrakta u mg mL⁻¹ kojima je tretiran plazmid

Slika 31. Vizualizacija oksidativnog oštećenja modelnog DNK plazmida (phiX174 RF1 DNA) potaknutog UV-fotolizom H₂O₂ prilikom tretmana ekstraktom trave ive.

Bitno je uočiti da, iako postoji statistički značajno ($p < 0,05$) oštećenje plazmida prilikom tretmana pri koncentracijama od 0,025, 0,050 i 0,150 mg mL⁻¹ u odnosu na negativnu kontrolu, taj učinak se smanjuje kako se povećava koncentracija polifenolnog ekstrakta trave ive. Nadalje, udio oštećene DNK pri skoro svim koncentracijama je manji u odnosu na pozitivnu kontrolu te se iz svega može zaključiti da polifenolni ekstrakt trave ive ima protektivni učinak na genetički materijal te da može smanjiti prooksidacijska oštećenja izazvana hidroksilnim radikalima.



= statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na pozitivnu kontrolu; * = statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,050 mg mL⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,150 mg mL⁻¹; d=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 0,500 mg mL⁻¹. Statistička obrada podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey posthoc test.

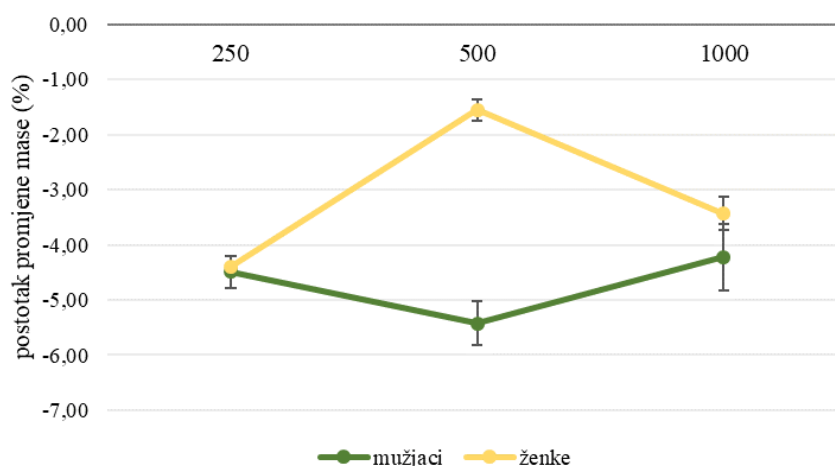
Slika 32. Genotoksični učinak ekstrakta trave ive na modelu plazmida phiX174 RF1 DNA.

4.4. *In vivo* biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive

U cilju proširenja saznanja o biološkim učincima polifenolnog ekstrakta trave ive kao smjese bioaktivnih spojeva s polifenolima kao dominantnim spojevima, provedeno je i istraživanje na *in vivo* modelu štakora. Određeni su biokemijski i hematološki parametri krvi, ispitan je genoprotektivni/genotoksični učinak te su utvrđene promjene markera oksidacijskog stresa, odnosno udjel karboniliranih proteina (KP), malondialdehida (MDA) i ukupnog glutationa (GSH) u stanicama tkiva jetre i bubrega.

4.4.1. Promjena mase štakora i pojedinih organa

Povećanje ili smanjenje tjelesne mase eksperimentalnih jedinki nakon tretmana, u odnosu na kontrolu, mogu poslužiti kao jedan od indikatora metaboličkih poremećaja. Prema Slici 33, nije utvrđen statistički značajan gubitak mase štakora nakon tretmana ekstraktom trave u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$) ni kod testiranih grupa mužjaka ni kod ženki. Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) promjena mase niti između pojedinih grupa unutar spola.



Statistička obrada provedena je Kruskal-Wallis testom. Vrijednosti označene istim slovima unutar skupine su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Slika 33. Promjena mase štakora u odnosu na kontrolu.

Rezultati iz Tablice 42 upućuju da nije bilo statistički značajne ($p > 0,05$) promjene mase jetre i bubrega u odnosu na kontrolnu grupu. Udjel jetre i bubrega kod mužjaka iznosio je između 3,2-3,8 % , odnosno 0,70-0,71 % na masu štakora, a i kod ženki ti rezultati bili su vrlo slični (3,2-3,8 % za jetru, 0,68-0,70 % za bubrege).

Tablica 42. Udjel jetre i bubrega na masu štakora

| Skupina | Jetra (%) | Bubrezi (%) |
|---------------|------------|-------------|
| K_M | 3,167±0,34 | 0,696±0,04 |
| 250_M | 3,513±0,15 | 0,708±0,04 |
| 500_M | 3,789±0,12 | 0,713±0,04 |
| 1000_M | 3,766±0,24 | 0,707±0,04 |
| K_Ž | 3,394±0,21 | 0,674±0,05 |
| 250_Ž | 3,221±0,31 | 0,700±0,02 |
| 500_Ž | 3,857±0,23 | 0,680±0,03 |
| 1000_Ž | 3,790±0,14 | 0,688±0,08 |

Statistička obrada provedena je Kruskal-Wallis testom. Vrijednosti označene istim slovima unutar skupine su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

4.4.2. Učinak na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora

Analiza biokemijskih i hematoloških parametara koristi se za procjenu općeg zdravstvenog stanja i indikaciju upalnih procesa. Na krvi štakora određeni su sljedeći parametri: ukupni proteini, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), LDH (laktat dehidrogenaza), glukoza, ukupni bilirubin, urea i kreatinin. Kod mužjaka (Tablica 43), uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti enzima AST i LDH pri koncentraciji ekstrakta od 500 i 1000 mg kg⁻¹ u odnosu na kontrolu. Kod ženki (Tablica 44), primijećen je gotovo identičan trend smanjenja aktivnosti i AST i LDH enzima pri koncentraciji od 500 i 1000 mg kg⁻¹ u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Ostali parametri su ostali statistički nepromijenjeni u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).

Tablica 43. Rezultati biokemijskih pretraga krvi muških štakora

| Biokemijski parametar | K_M | 250_M | 500_M | 1000_M |
|--|--------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Ukupni proteini (g L ⁻¹) | 67,33±7,17 | 63,98±3,24 | 63,60±4,87 | 64,50±3,16 |
| AST (U L ⁻¹) | 126,67±20,41 | 100,00±6,97 | 78,00±8,72 ^a | 85,00±4,60 [*] |
| ALT (U L ⁻¹) | 43,00±7,67 | 43,50±3,74 | 40,00±6,19 | 37,25±9,87 |
| LDH (U L ⁻¹) | 870,33±99,87 | 788,00±73,18 | 211,00±28,72 ^a | 439,33±32,08 [*] |
| Glukoza (mmol L ⁻¹) | 5,51±0,56 | 5,62±1,02 | 5,52±0,86 | 5,51±0,60 |
| Bilirubin ukupni (μmol L ⁻¹) | 1,73±0,51 | 3,73±4,46 | 4,66±4,92 | 2,67±0,44 |
| Urea (mmol L ⁻¹) | 6,33±0,56 | 5,40±0,17 [*] | 6,13±0,30 ^a | 6,15±0,37 ^a |
| Kreatinin (μmol L ⁻¹) | 25,75±1,58 | 25,75±2,31 | 26,00±1,51 | 28,50±2,20 |

^{*}=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; ^a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 250_M. Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

Tablica 44. Rezultati biokemijskih pretraga krvi ženskih štakora

| Biokemijski parametar | K_Ž | 250_Ž | 500_Ž | 1000_Ž |
|--|--------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Ukupni proteini (g L ⁻¹) | 62,83±3,53 | 63,88±4,58 | 67,38±2,31 | 67,77±2,60 [*] |
| AST (U L ⁻¹) | 111,00±18,81 | 106,00±12,72 | 82,75±6,73 ^a | 84,00±9,83 [*] |
| ALT (U L ⁻¹) | 47,75±6,61 | 41,25±9,72 | 43,75±7,30 | 38,67±5,67 |
| LDH (U L ⁻¹) | 777,00±51,36 | 445,54±56,45 | 329,67±37,50 [*] | 305,67±77,87 ^a |
| Glukoza (mmol L ⁻¹) | 5,50±0,51 | 5,52±1,14 | 5,45±0,66 | 5,41±0,59 |
| Bilirubin ukupni (μmol L ⁻¹) | 1,25±0,46 | 3,00±1,31 [*] | 1,75±0,46 | 1,67±0,44 |
| Urea (mmol L ⁻¹) | 5,88±0,19 | 5,70±0,43 | 5,98±0,53 | 6,30±0,46 |
| Kreatinin (μmol L ⁻¹) | 28,25±3,73 | 25,75±2,66 | 27,75±1,16 | 29,00±2,73 |

^{*}=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; ^a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 250_Ž. Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

Prema rezultatima hematoloških pretraga (Tablice 45 i 46), vidljiv je izostanak učinka ekstrakta na parametre krvi i kod mužjaka i ženki. Od svih analiziranih parametara kod obje tretirane grupe, može se primjetiti jedino statistički značajno ($p < 0,05$) sniženje koncentracije hemoglobina, prosječne mase hemoglobina po eritrocitu (MCH) i koeficijenta varijacije distribucije eritrocita (RDW) kod ženki tretiranih s 1000 mg kg^{-1} , u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Tablica 45. Rezultati hematoloških pretraga krvi muških štakora

| Hematološki parametar | K_M | 250_M | 500_M | 1000_M |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Leukociti ($\cdot 10^9 \text{ L}^{-1}$) | 7,63±3,57 | 7,73±1,05 | 7,05±2,58 | 10,05±1,35 |
| Eritrociti ($\cdot 10^{12} \text{ L}^{-1}$) | 8,55±0,28 | 8,66±0,69 | 8,66±0,45 | 8,79±0,41 |
| Hemoglobin (g L^{-1}) | 161,00±3,55 | 164,00±2,00 | 160,00±8,38 | 162,25±8,96 |
| Hematokrit (L L^{-1}) | 0,47±0,01 | 0,47±0,03 | 0,47±0,03 | 0,48±0,03 |
| MCV (fL) | 54,83±1,99 | 53,93±1,55 | 54,48±0,91 | 54,63±1,18 |
| MCH (pg) | 18,88±0,78 | 18,48±0,51 | 18,68±0,36 | 18,73±0,43 |
| MCHC (g L^{-1}) | 343,75±4,17 | 342,50±1,93 | 344,25±4,03 | 342,25±2,05 |
| RDW | 11,33±1,95 | 9,75±0,42 | 10,18±0,21 | 10,28±0,35 |
| MPV (fL) | 4,18±0,27 | 4,18±0,09 | 4,25±0,12 | 4,15±0,22 |
| Trombociti ($\cdot 10^9 \text{ L}^{-1}$) | 949,25±94,47 | 919,50±69,67 | 916,50±43,47 | 942,25±69,96 |

Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

Tablica 46. Rezultati hematoloških pretraga krvi ženskih štakora

| Hematološki parametar | K_Ž | 250_Ž | 500_Ž | 1000_Ž |
|---|---------------|-------------------------|---------------|--------------------------|
| Leukociti ($\cdot 10^9 \text{ L}^{-1}$) | 7,05±2,45 | 5,23±0,29 ^a | 5,53±0,98 | 6,90±1,04 ^a |
| Eritrociti ($\cdot 10^{12} \text{ L}^{-1}$) | 7,34±0,18 | 7,85±0,37 | 7,47±0,06 | 7,41±0,04 |
| Hemoglobin (g L^{-1}) | 149,00±1,31 | 148,33±8,08 | 145,00±3,46 | 144,33±0,87 [*] |
| Hematokrit (L L^{-1}) | 0,42±0,01 | 0,43±0,03 | 0,42±0,01 | 0,44±0,03 |
| MCV (fL) | 56,65±0,73 | 54,93±1,30 | 56,00±0,94 | 56,07±0,64 |
| MCH (pg) | 19,83±0,46 | 19,03±0,46 [*] | 19,48±0,55 | 19,43±0,04 |
| MCHC (g L^{-1}) | 346,50±5,68 | 346,00±0,76 | 347,75±7,07 | 346,33±1,75 |
| RDW | 10,20±0,79 | 9,77±0,04 | 9,70±0,45 | 9,17±0,17 ^{*a} |
| MPV (fL) | 4,13±0,19 | 4,10±0,13 | 4,00±0,11 | 4,23±0,17 ^b |
| Trombociti ($\cdot 10^9 \text{ L}^{-1}$) | 882,33±138,65 | 950,67±17,19 | 975,50±112,67 | 979,00±67,58 |

^{*}=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; ^a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 250_Ž; ^b=statistički značajno ($p < 0,05$) različito u odnosu na 500_Ž. Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

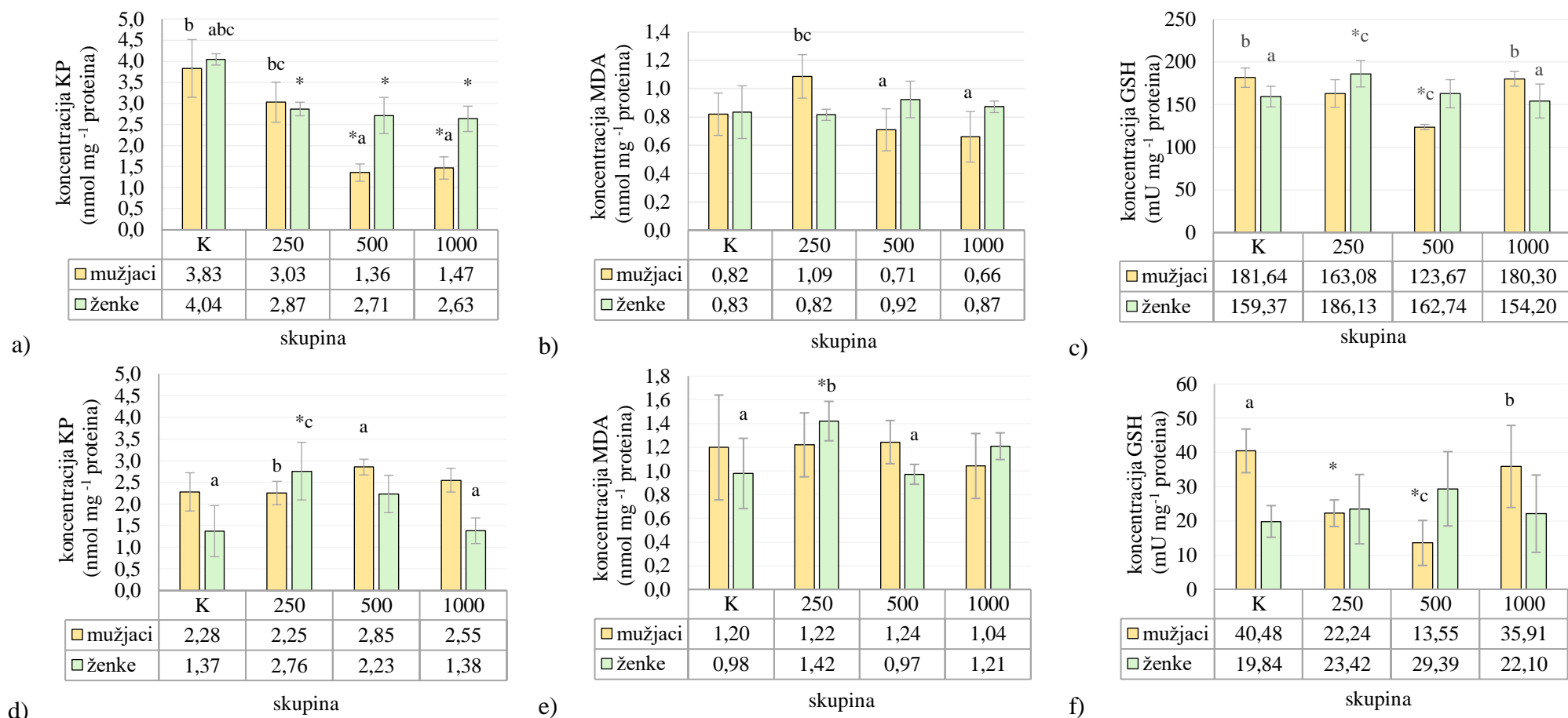
4.4.3. Učinak na markere oksidacijskog stresa u stanicama tkiva jetre i bubrega

U svrhu detekcije promjene markera oksidacijskog stresa, spektrofotometrijskim metodama izmjeren je intenzitet lipidne peroksidacije mjerenjem reaktivnog metabolita malondialdehida, udjela oksidiranih odnosno karboniliranih proteina te udjela ukupnog glutaciona u stanicama tkiva jetre i bubrega (Slika 34a-f).

Svi rezultati izraženi su na ukupan udjel proteina jetre i bubrega, a koji se nije statistički značajno razlikovao ($p > 0,05$) između spolova niti eksperimentalnih grupa štakora. Ukupan udjel proteina u jetri oba spola iznosio je 18,3-20,9 mg BSA mL⁻¹, dok su za bubrege te vrijednosti bile nešto niže (9,09-12,90 mg BSA mL⁻¹).

Kod jetre, uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje udjela karboniliranih proteina pri skoro svim koncentracijama ekstrakta neovisno o spolu, a u odnosu na kontrolu. Koncentracija malondialdehida nije se statistički značajno promijenila ($p > 0,05$) u odnosu na kontrolu ni kod mužjaka ni ženki, dok je tretman s 500 mg kg⁻¹ ekstrakta uzrokovao statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) koncentracije ukupnog glutaciona kod mužjaka (123,67 mU mg⁻¹ proteina), u odnosu na kontrolu (181,64 mU mg⁻¹ proteina). Međutim, kod ženki je primijećeno statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje ukupnog glutaciona tretiranjem s 250 mg kg⁻¹ ekstrakta, u odnosu na kontrolu.

Kod bubrega, detektirano je pak statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela karboniliranih proteina pri koncentraciji od 250 mg kg⁻¹ (2,76 nmol g⁻¹ proteina) kod ženki, u odnosu na kontrolu (1,37 nmol g⁻¹ proteina). Kao i kod analize karboniliranih proteina, nije detektiran statistički značajan ($p > 0,05$) učinak tretmana ekstraktom na redukciju malondialdehida kod mužjaka, dok je kod ženki opet primijećen trend povećanja udjela oksidiranih produkata (MDA) pri koncentraciji od 250 mg kg⁻¹, u odnosu na kontrolu. Obzirom na rezultate generiranog ukupnog glutaciona, kod mužjaka je detektirano statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje pri koncentraciji od 250 mg kg⁻¹ (22,24 mU mg⁻¹ proteina) i 500 mg kg⁻¹ (13,55 mU mg⁻¹ proteina), u odnosu na kontrolu (40,48 mU mg⁻¹ proteina). Kod ženki je izostao učinak ekstrakta, obzirom da nisu zabilježeni statistički značajno različiti udjeli ukupnog glutaciona ($p > 0,05$).



*=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 250 mg kg⁻¹; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 500 mg kg⁻¹; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 1000 mg kg⁻¹. Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

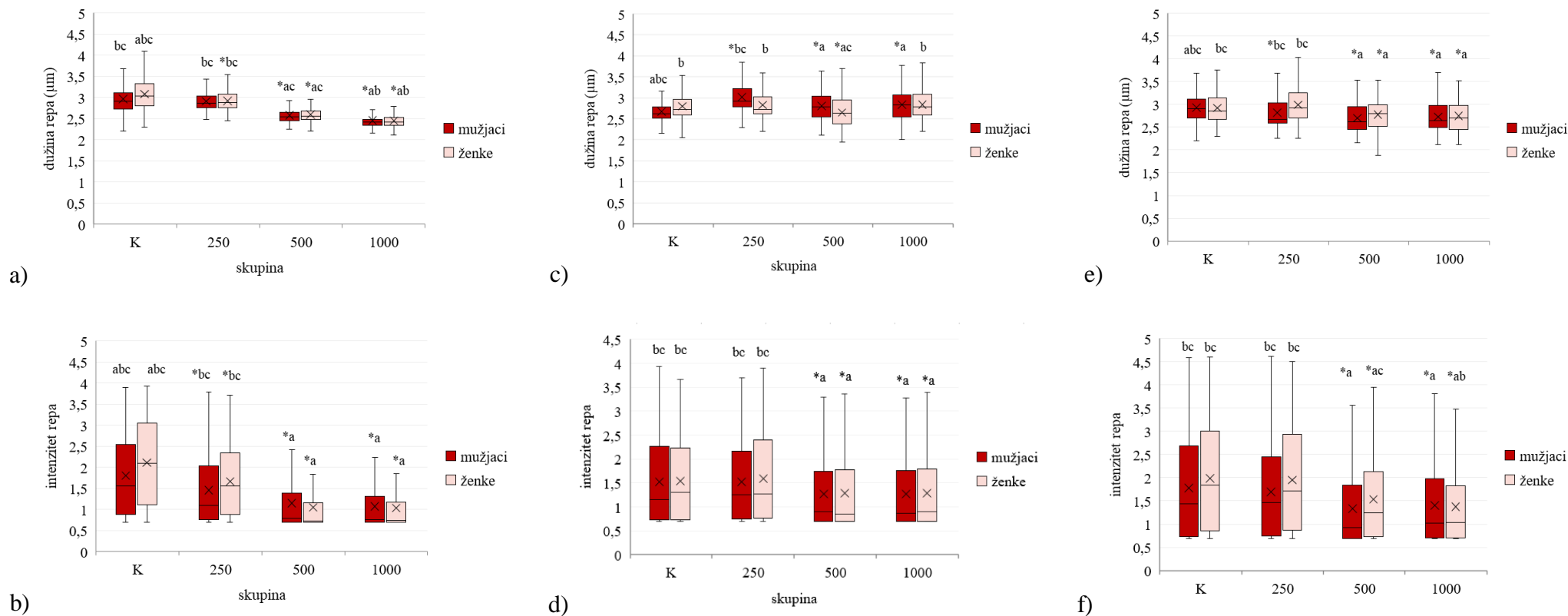
Slika 34. Utjecaj različitih koncentracija ekstrakta trave ive na promjenu udjela karboniliranih proteina (KP), malondialdehida (MDA) i ukupnog glutaciona (GSH) u stanicama tkiva jetre (a-c) i bubrega (d-f).

4.4.4. Učinak na parametare genotoksičnosti u krvi te jetri i bubrezima

U krvi se, obzirom na dužinu i intenzitet repa DNK, jasno može uočiti statistički značajno ($p < 0,05$) genoprotektivno djelovanje ekstrakta trave ive u koncentraciji od 500 i 1000 mg kg⁻¹ kod mužjaka, dok su kod ženki sve koncentracije pokazale statistički značajan ($p < 0,05$) genoprotektivni učinak, u odnosu na kontrolu (Slika 35a-b).

Na genetičkom materijalu jetre uočen je dualni učinak, ovisno o analiziranom parametru repa i spolu (Slika 35c-d). Tako se kod mužjaka može utvrditi statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje dužine repa nakon tretmana ekstraktom pri svim koncentracijama, u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Kod ženki je pak uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje dužine repa pri 250 mg kg⁻¹ i 500 mg kg⁻¹. Obzirom na rezultate intenziteta repa, može se uočiti statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) količine oštećenja DNK i kod ženki i mužjaka pri koncentracijama ekstrakta od 500 i 1000 mg kg⁻¹.

Vidljiv je statistički značajan ($p < 0,05$) genoprotektivni učinak svih koncentracija ekstrakta na bubrege mužjaka, dok je kod ženki isti detektiran pri 500 i 1000 mg kg⁻¹ (Slika 36e-f). Statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) količine oštećenja može se utvrditi analizom intenziteta repa, također nakon tretmana ekstraktom od 500 i 1000 mg kg⁻¹, neovisno o spolu, u odnosu na kontrolu.



*=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu; a=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 250 mg kg^{-1} ; b=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 500 mg kg^{-1} ; c=statistički značajno različito ($p < 0,05$) u odnosu na 1000 mg kg^{-1} . Statistička obrada rezultata provedena je Kruskal-Wallis testom.

Slika 35. Utjecaj ekstrakta trave ive na dužinu i intenzitet repa DNK u: a-b) krvi, c-d) jetri i e-f) bubrezima.

4.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjem

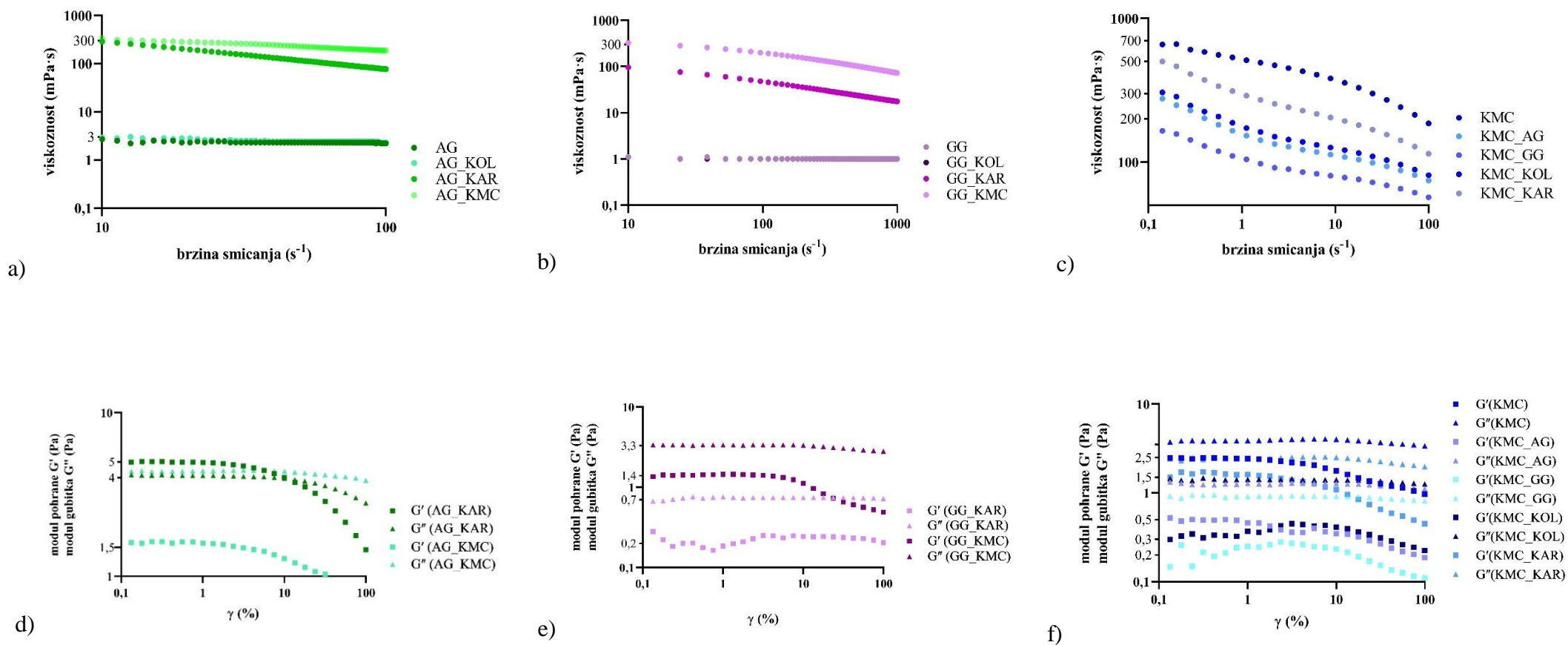
Prethodnim optimiranjem procesa sušenja raspršivanjem, uspješno je proizvedeno 13 inkapsuliranih dozirnih sustava, i to četiri na bazi arapske gume (AG, AG_KOL, AG_KAR, AG_KMC), četiri na bazi djelomično hidrolizirane guar gume (GG, GG_KOL, GG_KAR, GG_KMC) i pet na bazi karboksimetil celuloze (KMC, KMC_AG, KMC_GG, KMC_KOL i KMC_KAR).

4.5.1. Reološka karakterizacija otopina nosača

4.5.1.1. Rezultati viskoznosti i linearnog viskoelastičnog područja

Iz krivulje viskoznosti na Slici 36a-c, vidljivo je da polimerni sustavi AG i AG_KOL pokazuju Newtonovsko ponašanje fluida, dok je kod sustava AG_KAR te AG_KMC određeno ne-Newtonovsko, odnosno pseudoplastično ponašanje. Isti trend detektiran je i kod uzoraka na bazi djelomično hidrolizirane guar gume (Slika 36), dok su sve polimerne otopine na bazi karboksimetil celuloze pokazale pseudoplastično ponašanje. Za sve ne-Newtonovske, odnosno viskoelastične fluide, dodatno je testom amplitude određeno linearno viskoelastično područje (LVE) u cilju karakterizacije modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') (Slika 36d-f).

Prema omjeru modula gubitka i pohrane ($\tan \delta$), može se zaključiti da sustav AG_KAR ima veći udjel elastične komponente (0,83) dok je kod uzorka AG_KMC dominantno viskozno ponašanje, u odnosu na elastično (Tablica 47). Obzirom na izmjerenu apsolutnu viskoznost od 1 mPa·s, vidljivo je da su polimerne otopine GG i GG_KOL primjeri gotovo idealnih fluida, dok je dodatak karagenana i karboksimetil celuloze utjecao na modifikaciju ponašanja iz viskoznog u viskoelastično. Ipak, oba sustava GG_KAR i GG_KMC rezultirala su $\tan \delta > 1$, odnosno većim udjelom viskozne komponente u odnosu na elastičnu. Za razliku od uzoraka na bazi arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume, svi uzorci na bazi karboksimetil celuloze rezultirali su dominantnom viskoznom komponentom obzirom na rezultate modula pohrane, modula gubitka i faktora gubitka. Nadalje, jasno se vidi statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj susptitucije karboksimetil celuloze u udjelu od 25 % uvođenjem sekundarnih nosača, odnosno arapske gume (98,97 mPa·s), djelomično hidrolizirane guar gume (72,08 mPa·s), hidroliziranog kolagena (110,05 mPa·s) i karagenana (168,86 mPa·s), na smanjenje viskoznosti polimernih sustava.



Slika 36. Krivulje viskoznosti (a-c) i prikazi ovisnosti modula pohrane (G') i gubitka (G'') o smičnoj deformaciji (d-f) za otopine na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze.

Tablica 47. Rezultati modula pohrane (G'), modula gubitka (G''), faktora gubitka ($\tan \delta$) i viskoznosti za sve otopine nosača u ekstraktu

| Uzorak | G'_{LVE} (Pa) | G''_{LVE} (Pa) | $\tan \delta_{LVE}$ | η (mPa·s) [#] |
|---|------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>inkapsulati na bazi arapske gume</i> | | | | |
| AG | / | / | / | 2,80±0,40 ^a |
| AG_KOL | / | / | / | 3,25±0,75 ^b |
| AG_KAR | 5,07±0,10 [*] | 4,20±0,08 | 0,83±0,00 [*] | 167,90±3,60 ^{ab} |
| AG_KMC | 1,26±0,34 [*] | 3,78±0,63 | 3,10±0,32 [*] | 256,15±13,65 ^{ab} |
| <i>inkapsulati na bazi djelomično hidrolizirane guar gume</i> | | | | |
| GG | / | / | / | 1,00±0,00 ^a |
| GG_KOL | / | / | / | 1,00±0,00 ^b |
| GG_KAR | 0,22±0,04 [*] | 0,74±0,02 [*] | 3,43±0,68 | 73,45±2,89 ^{abc} |
| GG_KMC | 1,34±0,10 [*] | 3,39±0,04 [*] | 2,54±0,22 | 282,95±0,35 ^{abc} |
| <i>inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze</i> | | | | |
| KMC | 2,28±0,16 ^a | 3,95±0,07 ^a | 1,75±0,15 | 298,76±1,05 ^a |
| KMC_AG | 0,59±0,13 ^a | 1,39±0,12 ^{ab} | 2,44±0,33 | 98,97±0,22 ^a |
| KMC_GG | 0,32±0,07 ^a | 1,01±0,11 ^{ab} | 3,27±0,36 | 72,08±0,06 ^a |
| KMC_KOL | 0,45±0,08 ^a | 1,36±0,06 ^{ac} | 3,16±0,36 | 110,05±0,66 ^a |
| KMC_KAR | 1,30±0,32 | 2,44±0,01 ^{abc} | 2,01±0,51 | 168,86±0,78 ^a |

[#]=apsolutna, odnosno prividna viskoznost mjerena pri 25 s⁻¹; Statistička obrada podataka provedena je pomoću t-testa ili jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom ili znakom * unutar uzoraka na istoj bazi polimera u stupcu su statistički značajno različite (p<0,05).

4.5.2. Karakterizacija inkapsulata sušenih raspršivanjem

4.5.2.1. Fizikalni parametri inkapsulata

Rezultati analiziranih fizikalnih svojstava formuliranih **inkapsulata na bazi arapske gume** prikazani su u Tablici 48. Za binarni polimerni sustav AG_KOL, utvrđeno je statistički značajno (p<0,05) najveće iskorištenje procesa proizvodnje inkapsulata (77 %), za razliku od sustava AG_KAR (29,46 %) i AG_KMC (30,82 %) čije je iskorištenje bilo otprilike 2,5 puta statistički značajno manje (p<0,05). Suha tvar svih dobivenih prahova na bazi arapske gume bila je veća od 92,96 %. Vrijednosti izmjenjenog kontaktnog kuta za sustave na bazi arapske gume iznosile su redom: AG_KMC > AG_KOL > AG_KAR > AG, dok je prosječna veličina

čestica svih prahova bila u rangu od 3,56-7,41 μm , bez statistički značajnog odstupanja ($p > 0,05$). Prema rezultatima zeta potencijala, vidljivo je da je jedino uzorak AG_KAR rezultirao relativno elektrostatski stabilnom suspenzijom (-21,12 mV), za razliku od uzorka AG_KOL, koji nije pokazao prisutnost elektrostatskih repulzija između čestica u suspenziji metanola (-2,10 mV). Najmanji indeks polidisperzije (PI) određen je za uzorak AG (0,40), dok je za ostale uzorke bio relativno visok (0,75-0,85). Kod **inkapsulata na bazi djelomično hidrolizirane guar gume**, proces sušenja raspršivanjem bio je najmanje učinkovit za uzorak GG_KOL (20,35 %), dok je GG_KAR rezultirao najboljim iskorištenjem procesa (62,25 %). Usporedno s inkapsulatima na bazi arapske gume, dozirni sustavi na bazi djelomično hidrolizirane guar gume imali su manji udjel suhe tvari (88,17-92,19 %), pri čemu je samostalno korištena guar guma rezultirala inkapsulatom statistički značajno ($p < 0,05$) najmanjeg udjela zaostale vode. Slično kao i kod inkapsulata na bazi arapske gume, prosječna veličina čestica bila je u očekivanom rangu (3,22-7,78 μm) obzirom na korištenu mlaznicu prilikom atomizacije (160 μm). Rezultati zeta potencijala bili su u rasponu od -3,48 do -16,72 mV, što upućuje na nedovoljno stabilne koloidne suspenzije. Uzorak GG_KAR rezultirao je najpoželjnijim PI (0,31), dok je za ostale dozirne sustave na bazi djelomično hidrolizirane guar gume detektiran relativno visok PI (0,67-1,00). Rezultati kontaktnog kuta iznosili su redom: 66 ° za GG, 86 ° za GG_KAR, 90 ° za GG_KMC te 102 ° za GG_KOL, a što upućuje na prisutnu modifikaciju fizikalnih svojstava prilikom sušenja raspršivanjem. Rezultati analiziranih fizikalnih svojstava za **inkapsulate na bazi karboksimetil celuloze** također su prikazani u Tablici 48. Premda su sve polimerne otopine rezultirale niskim (32 %) do prosječnim (47-55 %) iskorištenjem tehnološkog procesa, vidljivo je da je zamjena baznog nosača sekundarnim, u udjelu od 25 % na ukupnu masu polimera, uvijek rezultirala statistički značajno ($p < 0,05$) poboljšanim iskorištenjem procesa. Obzirom na analiziranu suhu tvar dobivenih praškastih sustava, može se zaključiti da je uzorak KMC pri primijenjenim radnim uvjetima sušenja raspršivanjem vrlo prikladan nosač za dobivanje inkapsuliranih dozirnih sustava s minimalnim udjelom vode (94,48-97,20 %). Analizirani kontaktni kut za sve dobivene prahove bio je u rangu od 105-144 °, a što je indikator izrazitih hidrofobnih svojstava kontaktne površine u odnosu na prethodno analizirane uzorke na bazi arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume kod kojih je kontaktni kut bio < 90 °, a što upućuje na hidrofilna svojstva kontaktne površine. Premda je nešto više varirala u odnosu na inkapsulate na bazi arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume, prosječna veličina inkapsulata na bazi karboksimetil celuloze rezultirala je sličnim rangom veličine (1,88-10,32 μm). Slično kao i kod prethodno spomenutih inkapsulata, vrijednosti zeta potencijala iznosile su između -11 i -17,91 mV, a što je indikacija niskih

elektrostatskih repulzija između mikročestica. Među svim ispitivanim sustavima polimernih nosača, inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze karakteriziraju najveće, i time najneprikladnije vrijednosti indeksa polidisperzije (0,82-1,00).

Tablica 48. Fizikalna karakterizacija inkapsulata sušenih raspršivanjem

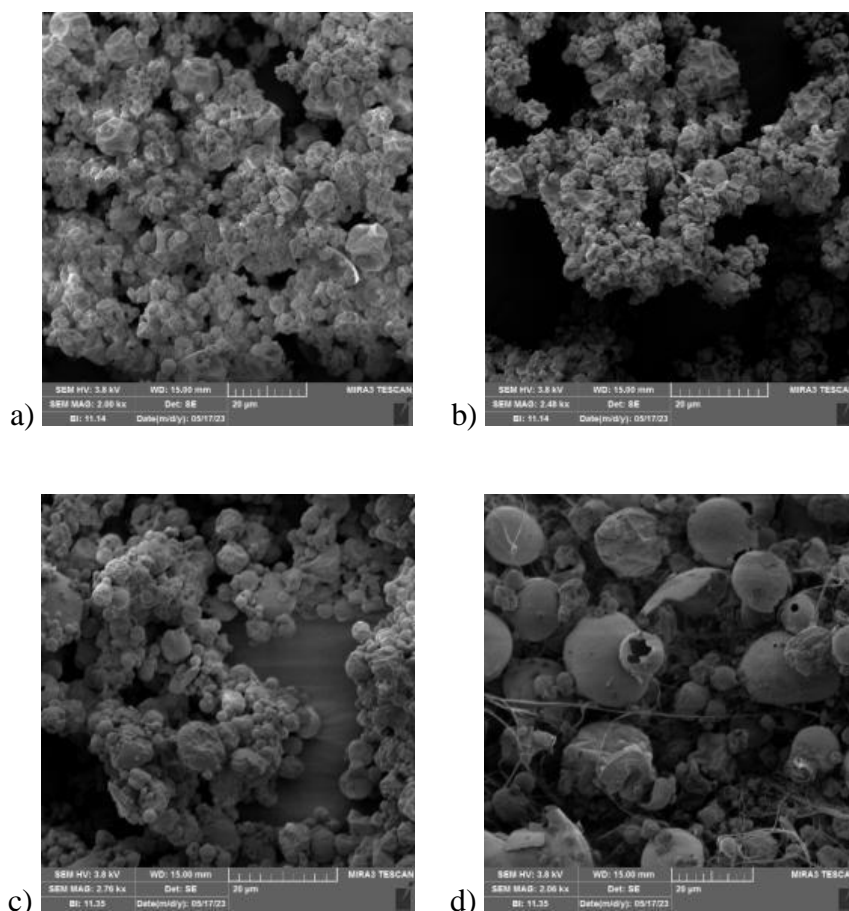
| Uzorak | Iskorištenje procesa (%) | Suha tvar (%) | Kontaktni kut (°) | Prosječna veličina čestica (µm) | Zeta potencijal (mV) | PI |
|---|---------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>inkapsulati na bazi arapske gume</i> | | | | | | |
| AG | 59,37±2,35 ^a | 95,92±0,29 | 62,50±0,50 ^a | 4,36±0,21 ^a | -9,07±0,82 ^a | 0,40±0,04 |
| AG_KOL | 77,13±5,67 ^{ab} | 92,96±0,88 ^a | 82,67±2,05 ^{ab} | 5,66±0,07 ^b | -2,10±0,24 ^{ab} | 0,81±0,19 |
| AG_KAR | 29,46±1,70 ^{ab} | 95,74±0,28 | 68,50±0,50 ^{bc} | 7,41±0,65 ^{ac} | -21,12±0,06 ^{abc} | 0,85±0,15 |
| AG_KMC | 30,82±7,33 ^{ab} | 98,35±0,77 ^a | 89,67±3,40 ^{ac} | 3,56±0,17 ^{bc} | -11,15±0,50 ^{bc} | 0,75±0,22 |
| <i>inkapsulati na bazi djelomično hidrolizirane guar gume</i> | | | | | | |
| GG | 59,36±3,05 ^a | 92,19±0,19 ^a | 66,00±1,00 ^a | 3,22±0,22 | -10,28±0,72 ^a | 0,67±0,01 ^a |
| GG_KOL | 20,35±4,99 ^{ab} | 88,17±0,38 ^a | 102,50±2,50 ^a | 3,49±0,13 | -3,48±0,06 ^{ab} | 0,98±0,02 ^{ab} |
| GG_KAR | 62,25±4,04 ^{bc} | 87,50±0,20 ^a | 86,00±1,00 | 7,78±0,77 | -14,37±1,15 ^{ab} | 0,31±0,03 ^{abc} |
| GG_KMC | 42,01±1,76 ^{abc} | 89,92±0,70 | 90,50±7,50 ^a | 7,78±2,23 | -16,72±0,14 ^{ab} | 1,00±0,00 ^{ac} |
| <i>inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze</i> | | | | | | |
| KMC | 32,55±2,15 ^a | 94,48±0,92 ^a | 144±1,00 ^a | 3,60±2,16 ^a | -15,59±0,24 ^a | 0,95±0,05 |
| KMC_AG | 53,16±4,99 ^a | 95,94±0,21 | 138±2,00 ^b | 10,32±0,42 ^{ab} | -17,91±0,48 ^{ab} | 1,00±0,00 |
| KMC_GG | 47,61±3,56 ^a | 96,27±0,05 | 140±1,00 ^c | 4,26±1,38 | -11,76±0,35 ^{abc} | 0,97±0,03 |
| KMC_KOL | 54,48±1,56 ^a | 97,20±0,11 ^a | 105±3,00 ^{abc} | 1,88±0,27 ^{bc} | -15,41±0,48 ^{bc} | 0,91±0,09 |
| KMC_KAR | 55,00±2,01 ^a | 96,92±0,34 | 107±2,00 ^{abc} | 8,80±0,21 ^c | -15,43±0,38 ^{bc} | 0,82±0,04 |

PI=indeks polidisperzije. Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom unutar iste skupine uzoraka u stupcu su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

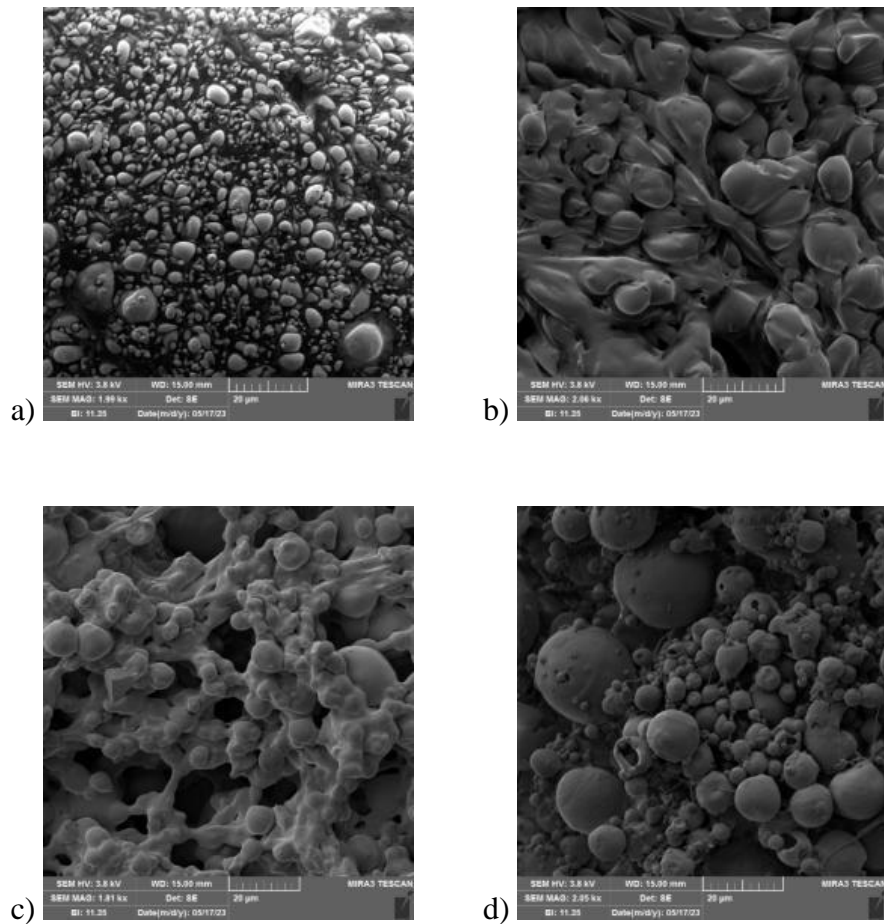
Na Slici 37a-d prikazani su inkapsulati na bazi arapske gume, te su vidljive značajne razlike ovisno o sastavu nosača. SEM mikrografija uzorka AG ukazuje na prisutnost čestica konkavnog oblika i relativno deformirane površine, s tendencijom aglomeracije. Supstitucijom arapske gume s karagenanom, djelomično se smanjuju prethodno prisutne deformacije oblika uz povećanje prosječne veličine čestica. Uvođenje karboksimetil celuloze rezultiralo je značajnim poboljšanjem morfologije mikročestica, uz redukciju broja konkavnih oblika i povećanje broja mikročestica uniformnog oblika. Također, primijećeno je i mjestimično formiranje vlaknastih struktura isprepletenih između mikročestica.

Na Slici 38a-d prikazane su SEM mikrografije inkapsuliranih dozirnih sustava na bazi djelomično hidrolizirane guar gume. Njena samostalna primjena rezultirala je relativno neprikladnim morfološkim oblicima, više nalik slijepljenim strukturama međusobno povezanih mikročestica. Binarni sustavi nosača GG_KOL i GG_KAR nisu rezultirali poboljšanjem izgleda, nego čak pojačanom tvorbom umreženih struktura, nedefiniranih oblika. Sustav GG_KMC rezultirao je značajnim poboljšanjem morfologije, tvoreći sferične i relativno uniformne čestice, uz djelomičnu prisutnost ruptura na površini.

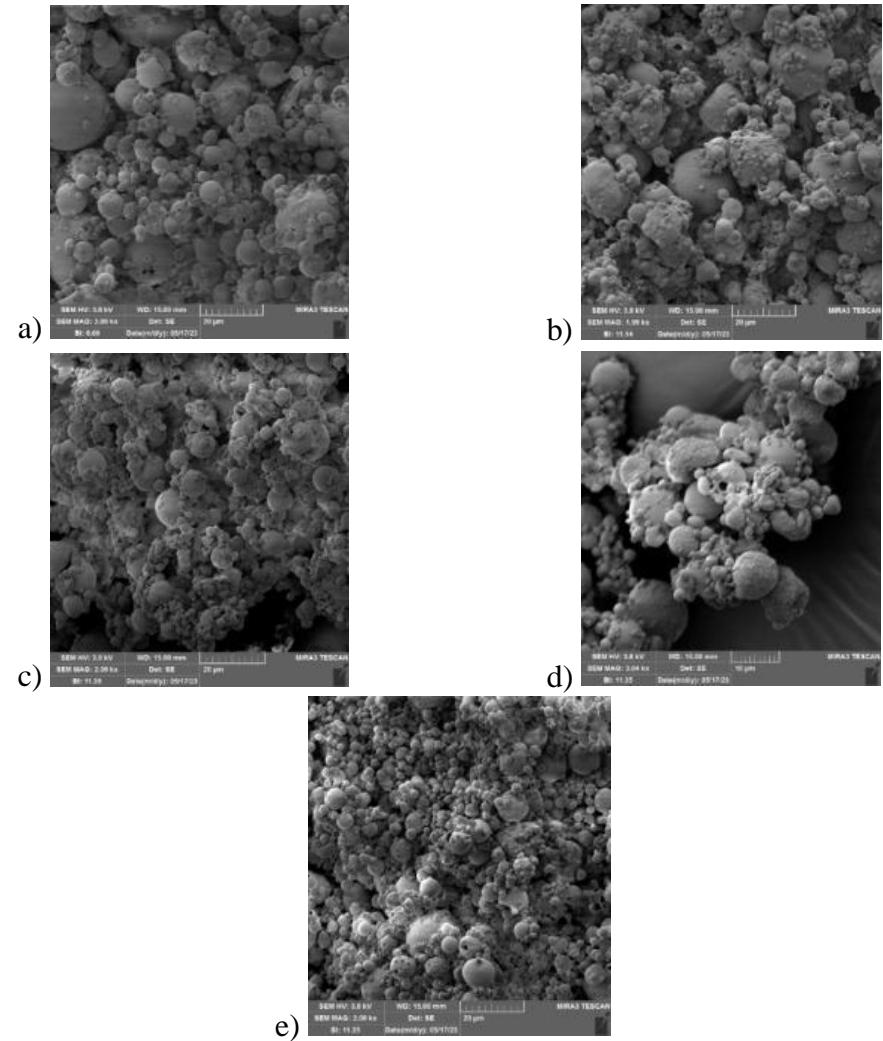
Inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze prikazani su na Slici 39a-e i vidljivo je da su sve kombinacije nosača rezultirale relativno prikladnom morfologijom inkapsulata. Primijećena je prisutnost pukotina na površini čestica te djelomično prisutni polusferni oblici kod inkapsulata KMC, KMC_KOL te KMC_GG. Nisu primijećeni konkavni ili konusni morfološki oblici, a na priloženim mikrografijama evidentna je i tendencija stvaranju aglomeriranih oblika.



Slika 37. SEM mikrografije inkapsulata na bazi arapske gume: a) AG, b) AG_KOL, c) AG_KAR, d) AG_KMC.



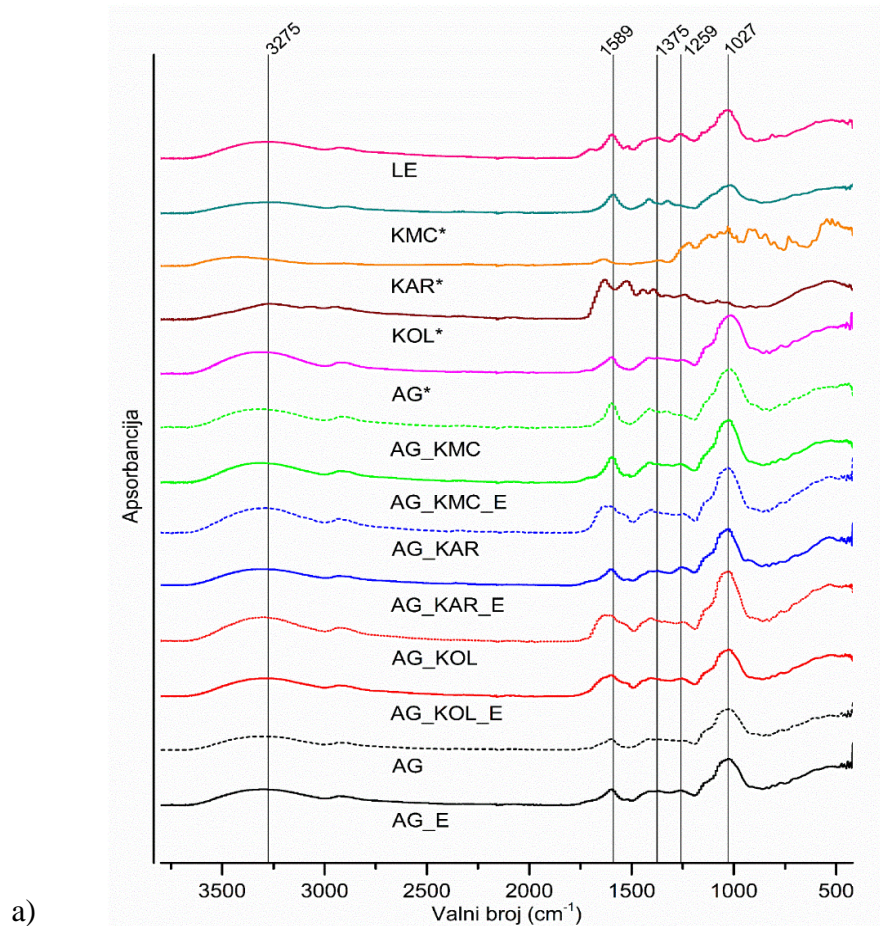
Slika 38. SEM mikrografije inkapsulata na bazi djelomično hidrolizirane guar gume: a) GG, b) GG_KOL, c) GG_KAR, d) GG_KMC.



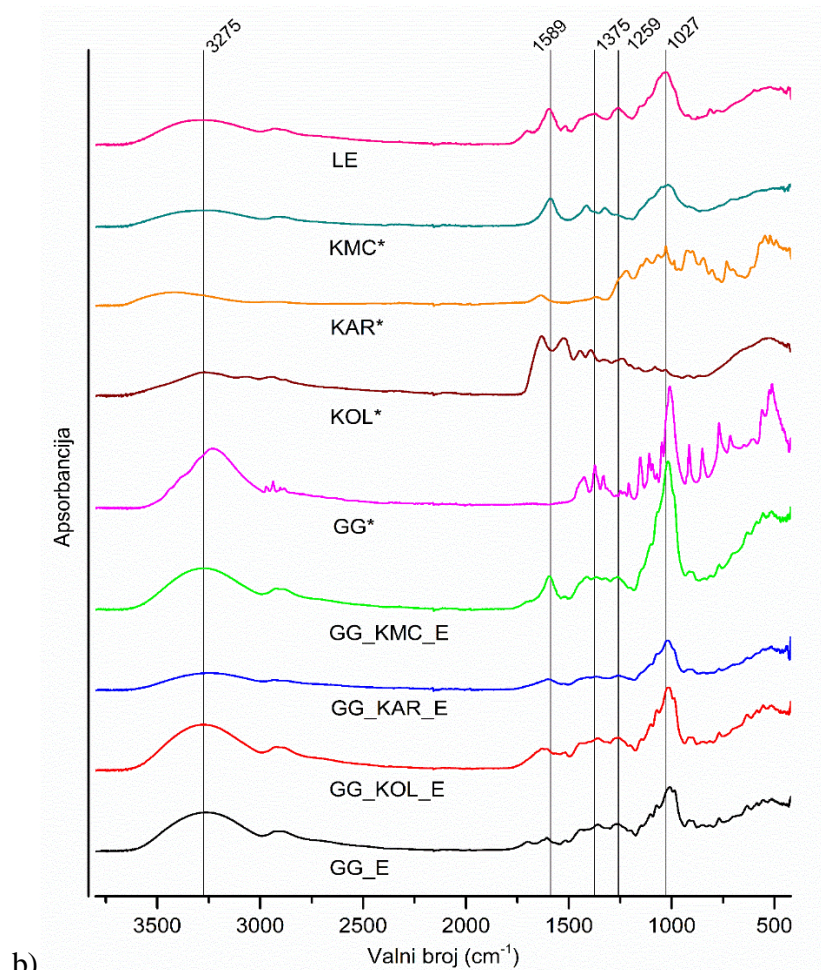
Slika 39. SEM mikrografije inkapsulata na bazi karboksimetil celuloze: a) KMC, b) KMC_GG, c) KMC_AG, d) KMC_KAR, e) KMC_KOL.

4.5.2.2. ATR-FT-IR spektri funkcionalnih skupina nosača i inkapsulata

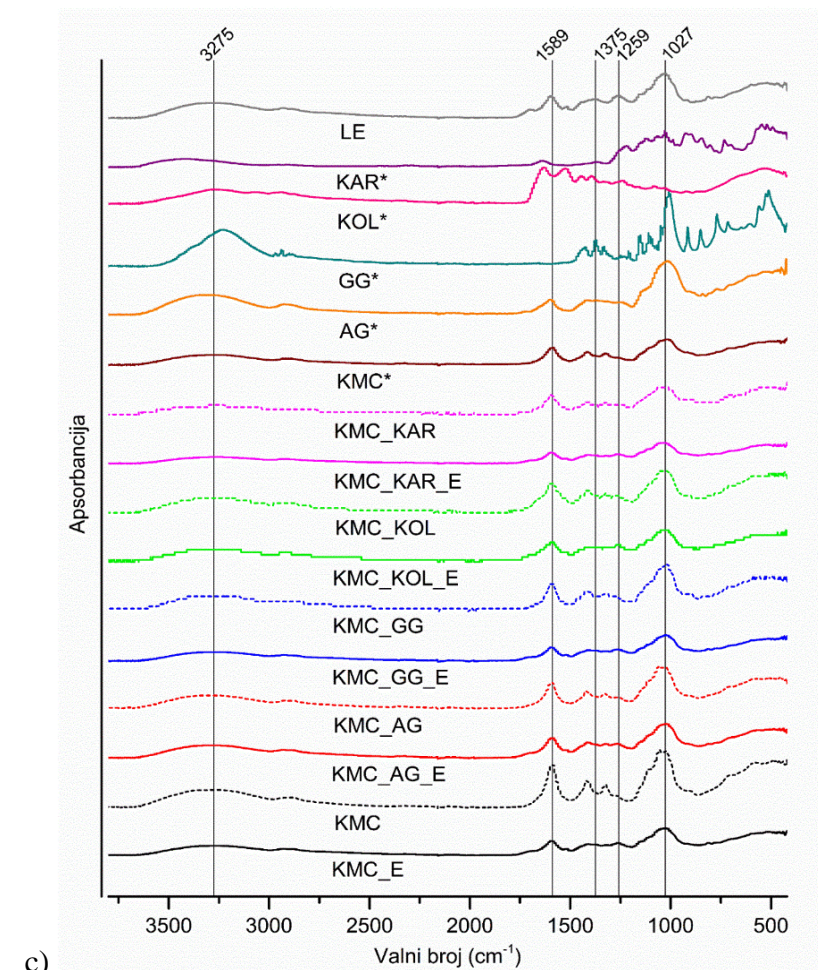
Na Slici 40a-c, objedinjeni su ATR-FT-IR spektri inkapsuliranih dozirnih sustava ekstrakta trave ive na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze, kao i spektri polimernih sustava nosača bez ekstrakta, polimernih nosača te liofilizirani ekstrakt.



LE=liofilizirani ekstrakt; KMC*=karboksimetil celuloza; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; AG*=arapska guma; bez _E=inkapsulati bez ekstrakta; sa _E=inkapsulati s ekstraktom



b) LE=liofilizirani ekstrakt; KMC*=karboksimetil celuloza; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; GG*=djelomično hidrolizirana guar guma; bez _E=inkapsulati bez ekstrakta; sa _E=inkapsulati s ekstraktom



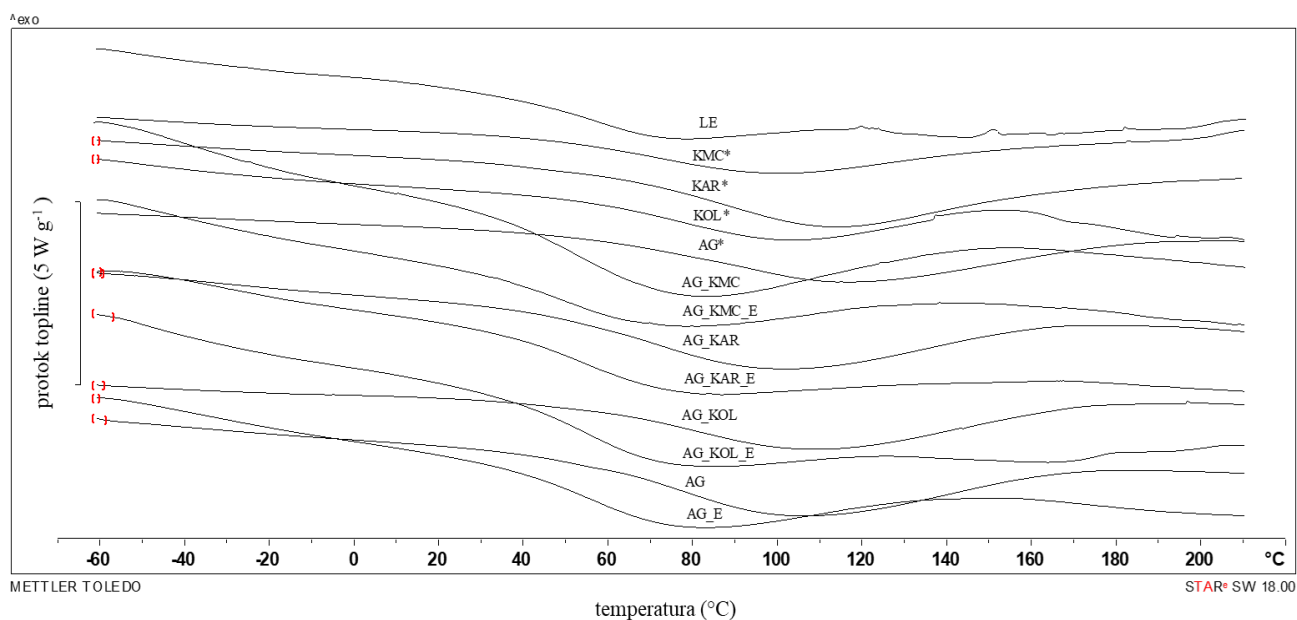
c) LE=liofilizirani ekstrakt; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; GG*=djelomično hidrolizirana guar guma; AG*=arapska guma; KMC*=karboksimetil celuloza; bez _E=inkapsulati bez ekstrakta; sa _E=inkapsulati s ekstraktom

Slika 40. ATR-FT-IR spektri nosača i formuliranih inkapsulata na bazi: a) arapske gume, b) djelomično hidrolizirane guar gume i c) karboksimetil celuloze.

4.5.2.3. Termogrami nosača i inkapsulata dobiveni razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)

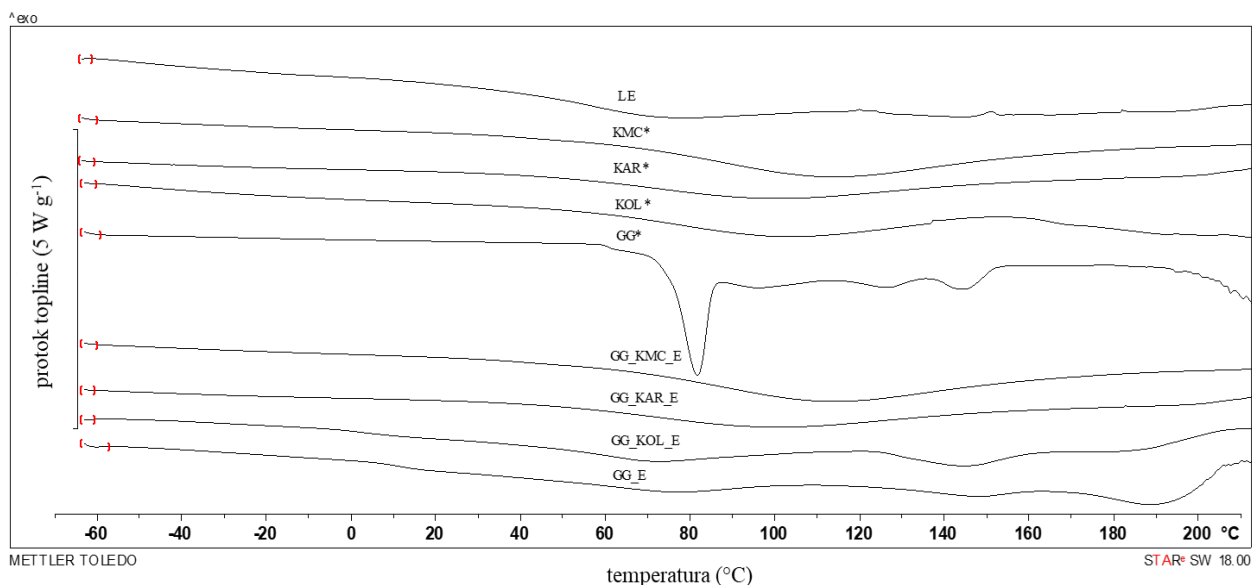
Na Slikama 41, 42 i 43 prikazani su DSC termogrami analiziranih inkapsulata na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze, sustava polimernih kombinacija bez ekstrakta, a koji su prošli identičan eksperimentalni proces kao i inkapsulati, polimera te liofiliziranog ekstrakta.

Na svim termogramima, neovisno o setu kombinacija polimernih nosača, nije detektiran niti jedan fazni prijelaz. Blagi negativni pikovi na Slici 41 uočeni u rasponu temperatura od 32-121 ° C, zatim od 82-113 ° C na Slici 41, te u rasponu od 72 do 110 ° C na Slici 43, odgovaraju endotermnoj reakciji isparavanja vode prisutne u istraživanim uzorcima.



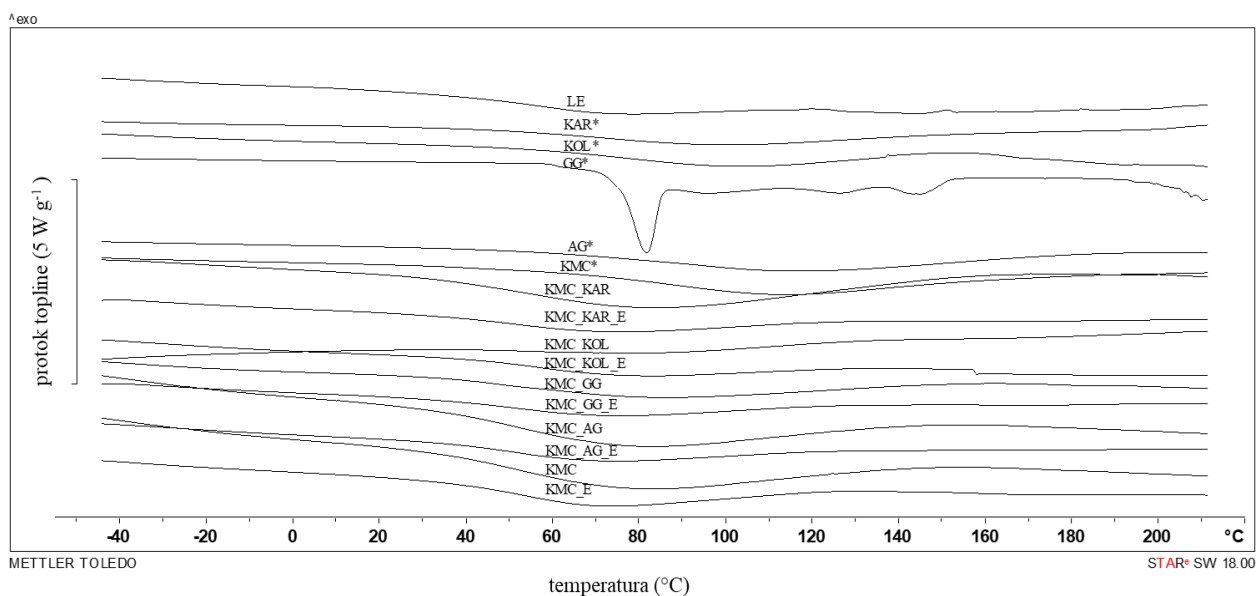
LE=liofilizirani ekstrakt; KMC*=karboksimetil celuloza; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; AG*=arapska guma; bez _E= inkapsulati bez ekstrakta; sa _E=inkapsulati s ekstraktom

Slika 41. DSC termogrami korištenih nosača i inkapsulata na bazi arapske gume.



LE=liofilizirani ekstrakt; KMC*=karboksimetil celuloza; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; GG*=djelomično hidrolizirana guar guma; bez _E=inkapsulati bez ekstrakta; sa_E= inkapsulati s ekstraktom

Slika 42. DSC termogrami korištenih nosača i inkapsulata na bazi djelomično hidrolizirane guar gume.



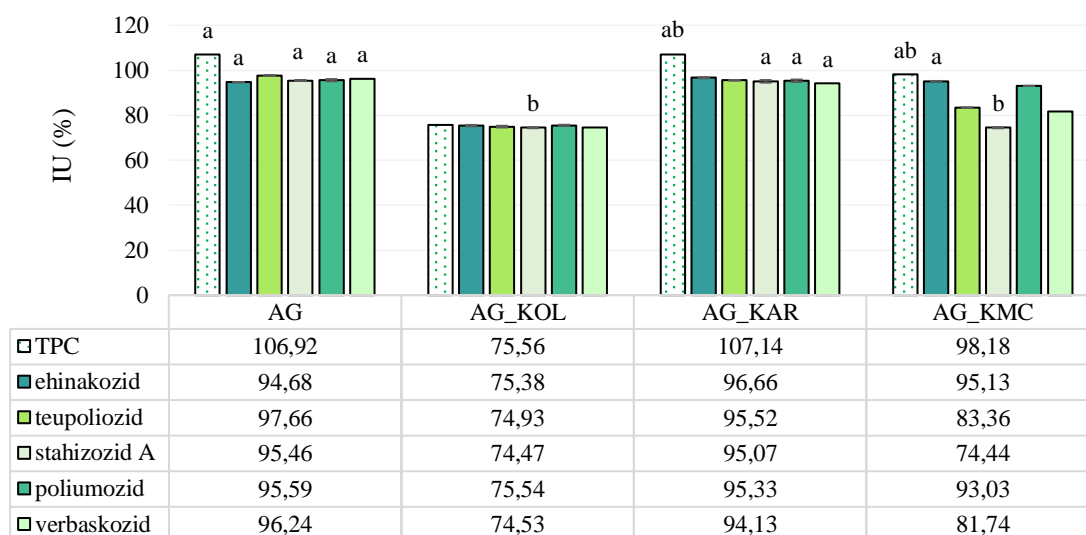
LE=liofilizirani ekstrakt; KAR*=kappa-karagenan; KOL*=hidrolizirani kolagen; GG*=djelomično hidrolizirana guar guma; AG*=arapska guma; KMC*=karboksimetil celuloza; bez _E=inkapsulati bez ekstrakta; sa_E=inkapsulati s ekstraktom

Slika 43. DSC termogrami korištenih nosača i inkapsulata na bazi karboksimetil celuloze.

4.5.2.4. Bioaktivna svojstva inkapsulata

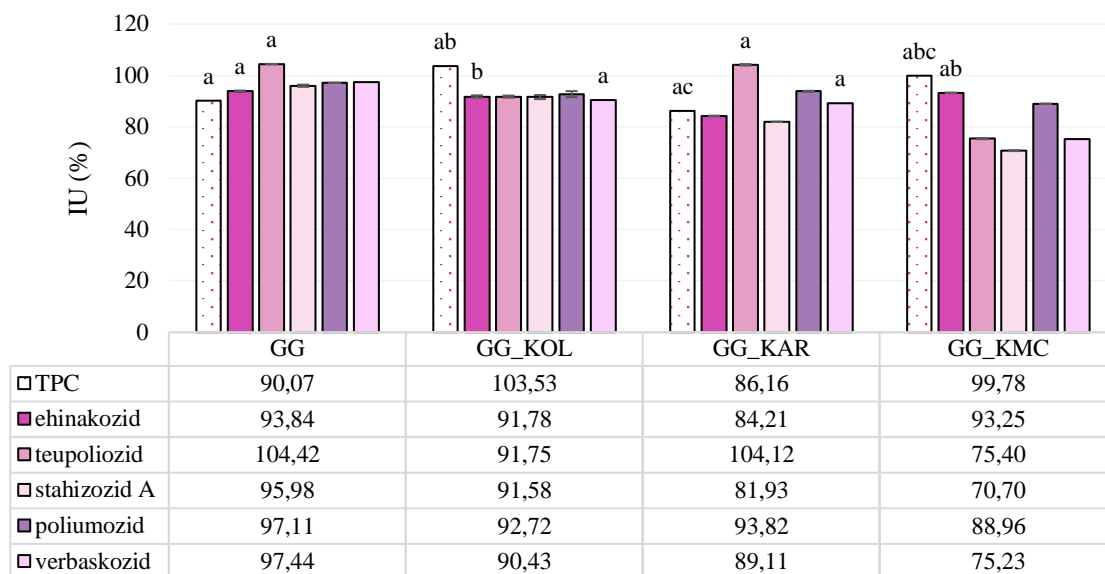
Rezultati inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola (TPC) te pojedinačnih feniletanoidnih glikozida, odnosno ehinakozida, teupoliozida, stahizozida A, poliumozida i verbaskozida, za inkapsulirane dozirne sustave na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze prikazani su na Slici 44a-c.

Svi formulirani **inkapsulati na bazi arapske gume** rezultirali su sličnom inkapsulacijskom učinkovitošću TPC-a (98,18-107,14 %), osim AG_KOL (75,56 %) sa statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenim udjelom TPC-a. Isti trend primijećen je i kod udjela feniletanoidnih glikozida, pri čemu je AG_KOL rezultirao najmanjom, no i dalje zadovoljavajućom inkapsulacijskom učinkovitošću za sve promatrane spojeve (74,47-75,56 %). Kod **inkapsulata na bazi djelomično hidrolizirane guar gume**, vrijednosti IU za TPC iznosile su od 86,16 do 103,53 %, dok je GG_KMC rezultirao statistički značajno ($p < 0,05$) najmanjim zadržavanjem teupoliozida (75,40 %), stahizozida A (70,70 %), poliumozida (88,96 %) i verbaskozida (75,23 %) u odnosu na ostale inkapsulate ($p < 0,05$). U odnosu na prethodno analizirane dozirne sustave, **inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze** rezultirali su nešto nižim vrijednostima inkapsulacijske učinkovitosti TPC-a (70,82-88,64 %). Kombinacija nosača KMC_KAR pokazala se statistički značajno ($p < 0,05$) najmanje prikladnom za zadržavanje svih ispitivanih feniletanoidnih glikozida (76,25 % za stahizozid A-80,41 % za ehinakozid), a u odnosu na ostale kombinacije s karboksimetil celulozom kao baznim nosačem.



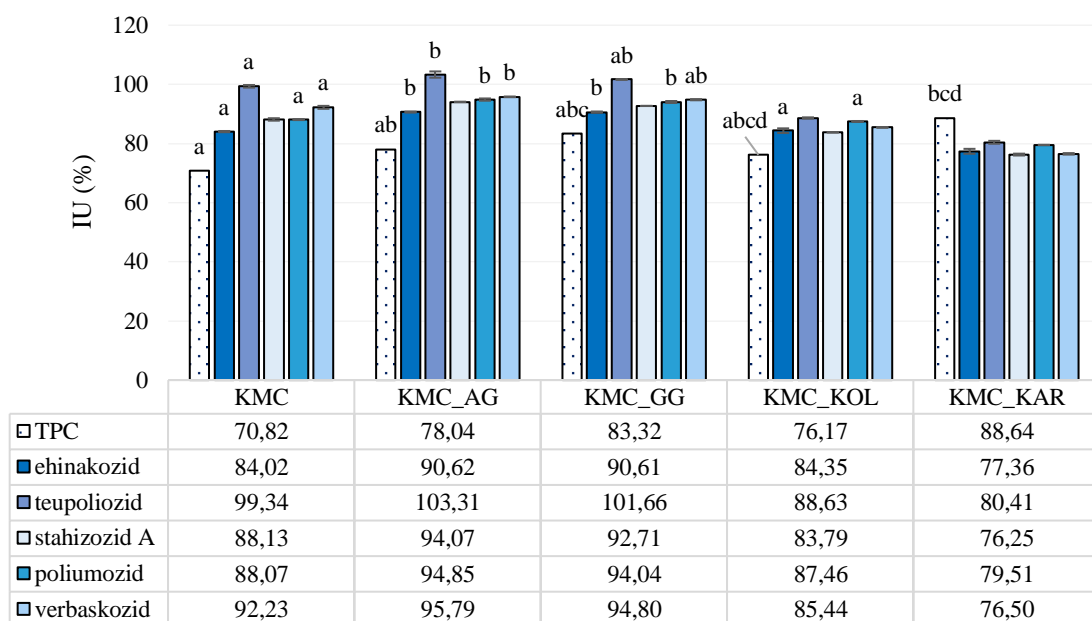
a)

Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test.



b)

Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test.



c)

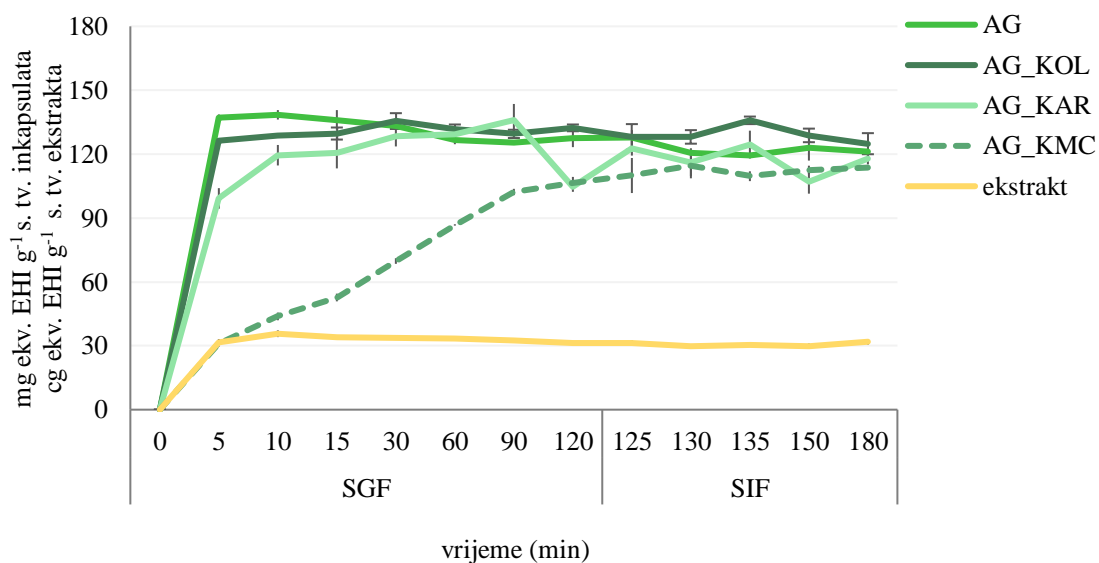
Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test.

Slika 44. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (TPC) i pojedinačnih polifenola za inkapsulate na bazi: a) arapske gume, b) djelomično hidrolizirane guar gume i c) karboksimetil celuloze.

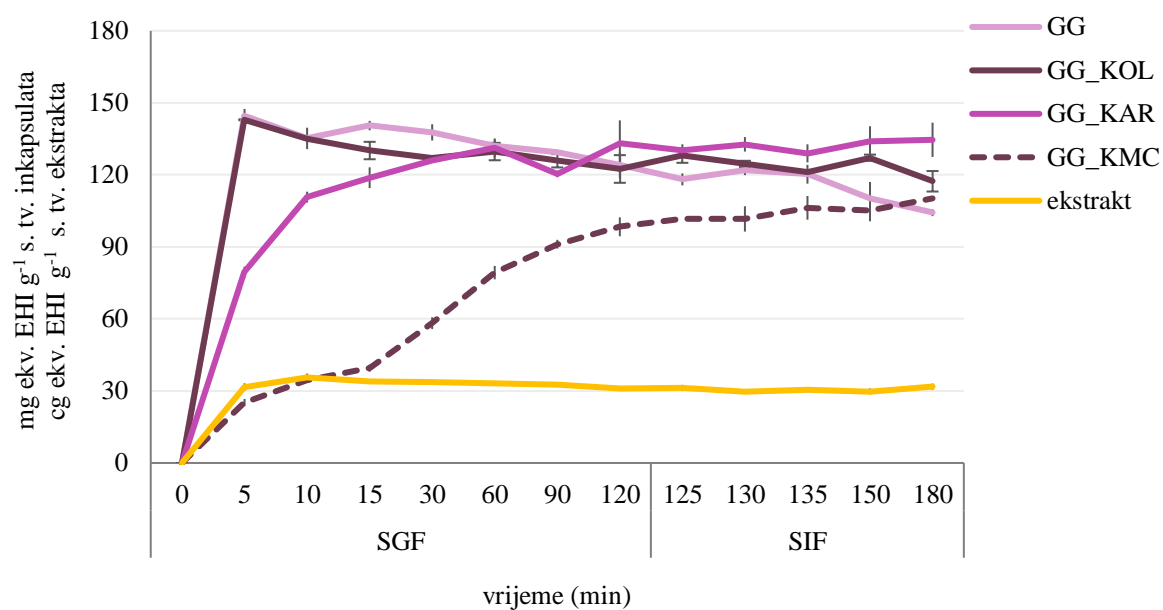
Na Slici 45a-c, prezentirani su rezultati udjela ukupnih polifenola otpuštanih tijekom *in vitro* simulirane probave inkapsulata obogaćenih ekstraktom trave ive. Kod inkapsulata na bazi arapske gume, primijećeno je gotovo trenutno otpuštanje polifenolnih spojeva u simuliranoj želučanoj fazi (SGF) iz dozirnih sustava AG i AG_KOL (nakon 5 minuta). Kod AG_KAR, otpuštanje polifenola je prolongirano 10 minuta dulje u odnosu na AG i AG_KOL, dok je poželjno postepeno otpuštanje polifenola u SGF fazi tijekom svih 120 minuta, postignuto jedino kod dozirnog sustava AG_KMC, s daljnjim nastavkom trenda i u simuliranoj intestinalnoj fazi (SIF) kroz svih 60 minuta.

Kod dozirnih sustava na bazi djelomično hidrolizirane guar gume, može se primijetiti gotovo identičan trend kao i kod inkapsulata na bazi arapske gume. Tako su GG, GG_KOL i GG_KAR rezultirali sličnim trendom ubrzanog otpuštanja polifenola tijekom prvih 30 minuta SGF faze, dok je formulacija GG_KMC rezultirala najpoželjnijom kinetikom otpuštanja polifenolnih spojeva kroz svih 180 minuta *in vitro* simulirane probave.

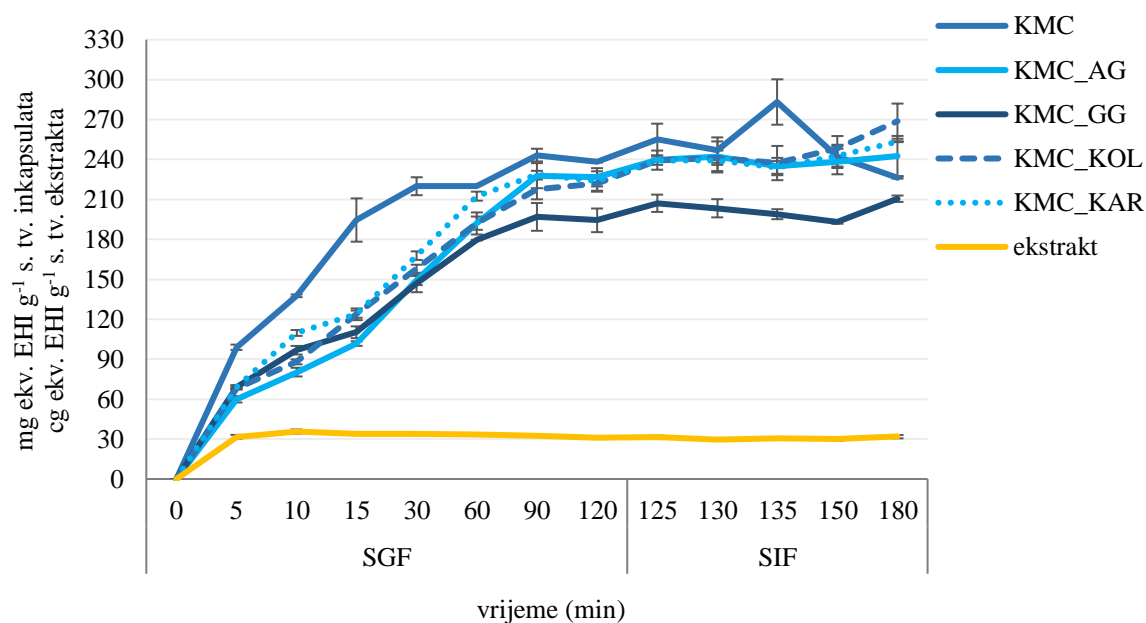
Inkapsulati na bazi KMC-e, također su rezultirali vrlo povoljnim profilom postepenog oslobađanja ciljanih komponenata ekstrakta. Uzorke KMC_AG, KMC_KOL te KMC_KAR karakterizira slična kinetika oslobađanja polifenola tijekom obje faze simulirane probave (SGF i SIF), pri čemu je ipak najveći udjel ukupnih polifenola otpušten u prvih 60 minuta simulirane probave. Dozirni sustav KMC_GG također je rezultirao vrlo prikladnim profilom otpuštanja tijekom cijele SGF faze (120 minuta). Međutim, ulaskom u SIF fazu pri pH=7, uočena je stagnacija navedenog trenda.



a)



b)



c)

Slika 45. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola u *in vitro* uvjetima probavnog sustava za inkapsulate na bazi: a) arapske gume, b) djelomično hidrolizirane guar gume i c) karboksimetil celuloze.

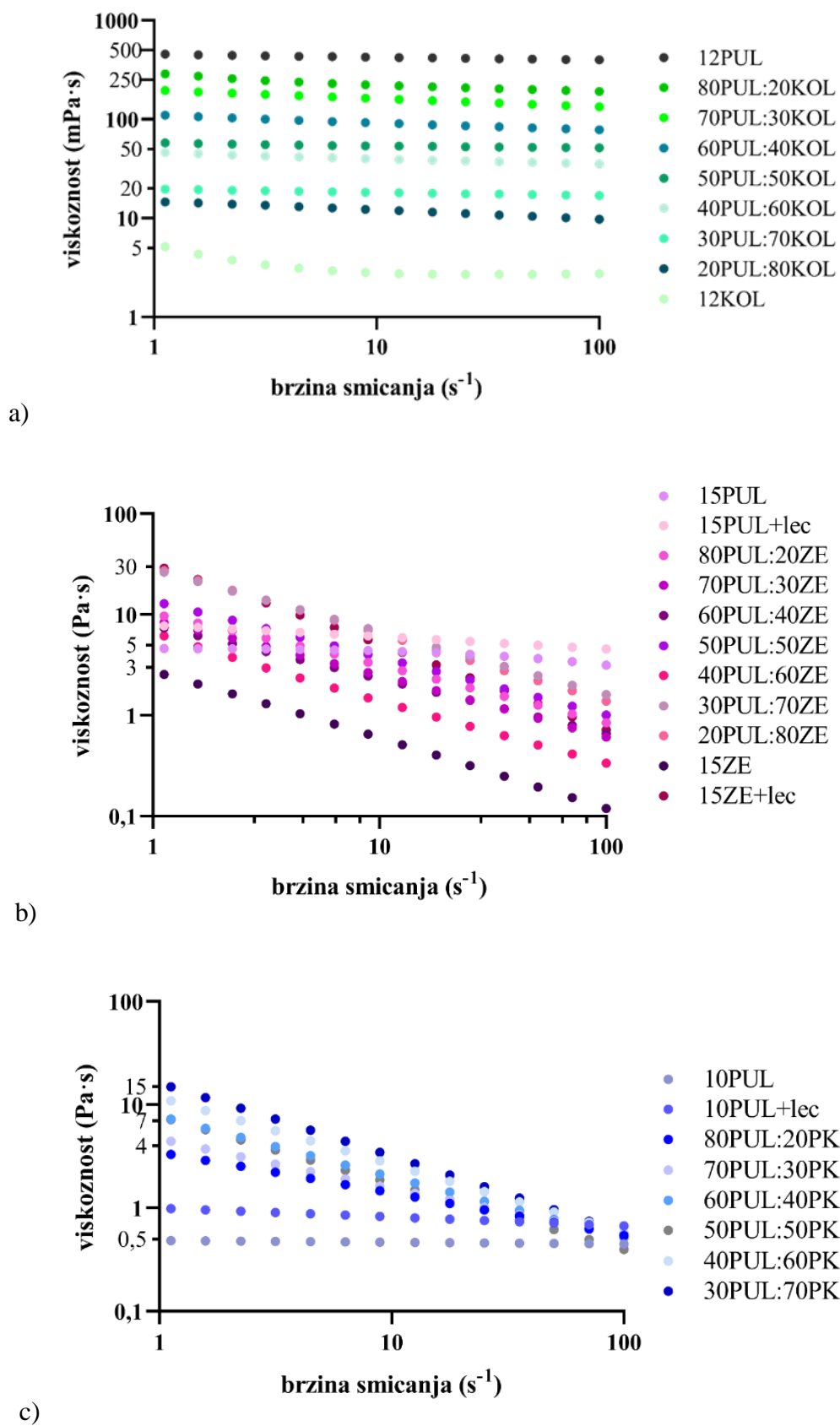
4.6. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive elektroispredanjem

Od ukupno 28 pripremljenih polimernih otopina formuliranih obzirom na varijaciju omjera pululana, hidroliziranog kolagena, zeina i izolata proteina konoplje, proces elektroispredanja bio je uspješno proveden za njih 20.

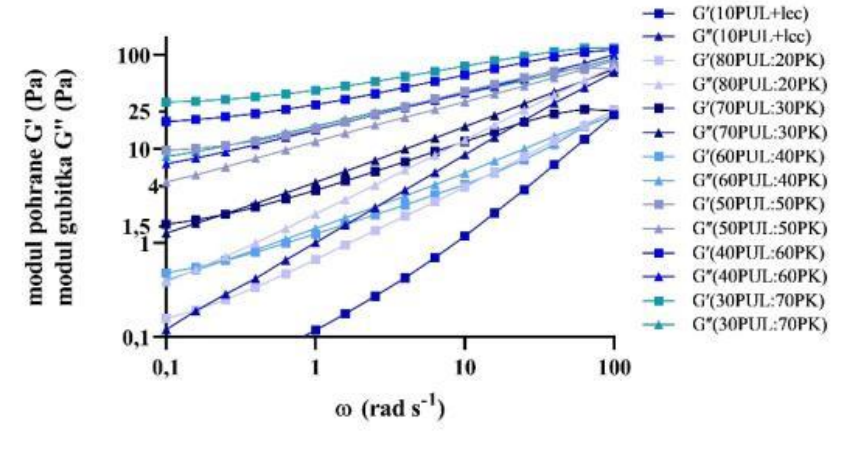
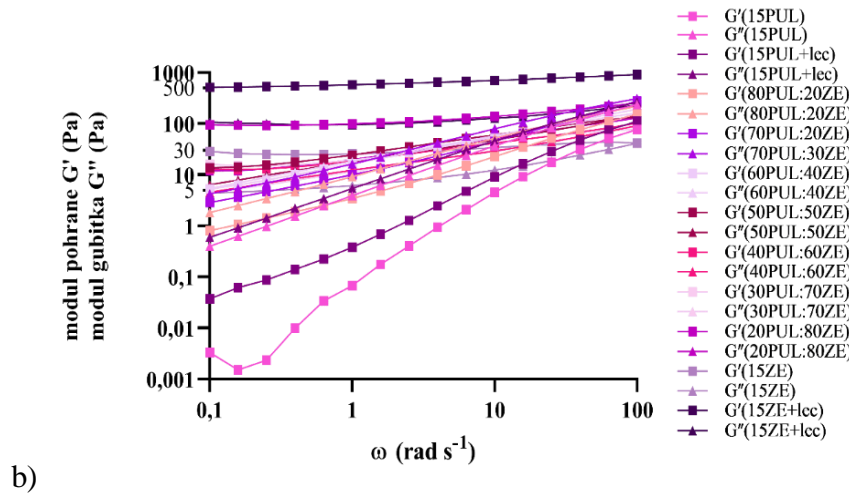
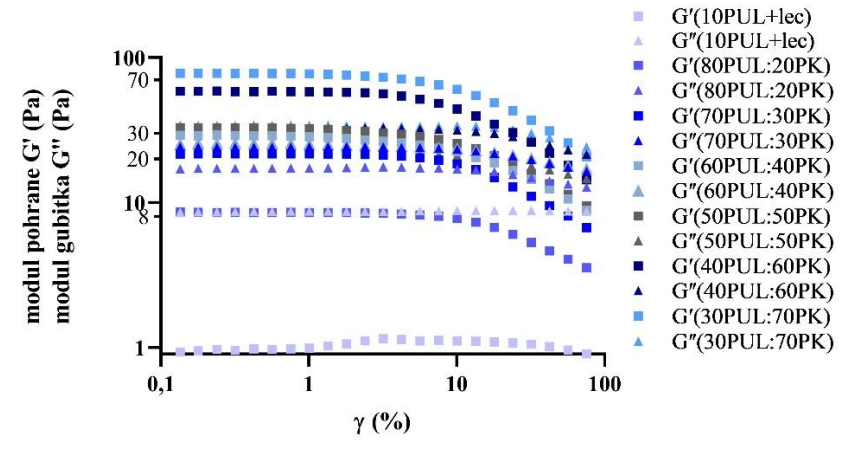
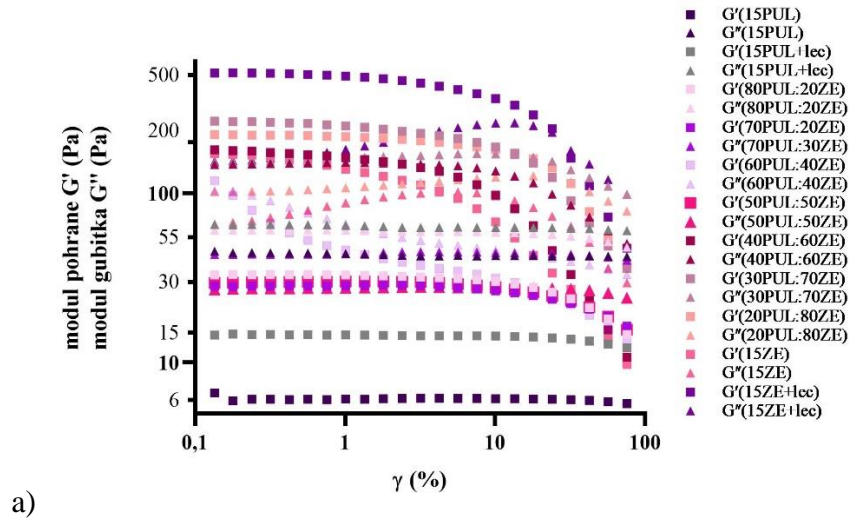
4.6.1. Reološka karakterizacija otopina nosača

Na Slici 46a-c prikazane su krivulje viskoznosti svih testiranih otopina nosača na bazi pululana i hidroliziranog kolagena (PUL:KOL), pululana i zeina (PUL:ZE) te pululana i proteina konoplje (PUL:PK) u ekstraktu trave ive. Iz krivulja se može zaključiti da su sve PUL:KOL otopine Newtonovski fluidi obzirom na izmjerenu konstantnu viskoznost pri zadanom rangu brzina smicanja, dok PUL:ZE te PUL:PK polimerni sustavi posjeduju pseudoplastičan karakter, osim uzorka 10PUL koji je Newtonovski fluid. Dodatno, na pseudoplastičnim fluidima izvršen je test amplitude i frekvencije u svrhu definiranja linearnog viskoelastičnog područja (eng. *linear viscoelastic range*, LVE), odnosno viskoelastičnog karaktera unutar LVE (Slika 47a-b i Slika 48a-b). Uočen je značajan utjecaj povećanja udjela zeina, odnosno proteina konoplje na produljenje LVE područja unutar ranga primijenjene smične deformacije (γ), a što direktno korelira s povećanim udjelom elastične komponente unutar testiranih otopina.

Uočen je statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj povećanja udjela, i zeina i proteina konoplje, u odnosu na pululan, na povećanje prividne viskoznosti. Primijećen je i statistički značajan ($p < 0,05$) učinak dodatka suncokretovog lecitina na povećanje prividne viskoznosti u odnosu na čisti zein ($p < 0,05$), kao i modifikaciju viskoznosti (μ) te viskoelastičnih svojstava otopina pululana (15PUL i 10PUL).



Slika 46. Krivulje viskoznosti otopina nosača na bazi: a) pululana i hidroliziranog kolagena, b) pululana i zeina, c) pululana i proteina konoplje.



Slika 47. Krivulja ovisnosti: a) modula pohrane (G') i gubitka (G'') o (γ) smičnoj deformaciji, b) modula pohrane (G') i gubitka (G'') o kutnoj frekvenciji (ω) za otopine na bazi pululana i zeina.

Slika 48. Krivulja ovisnosti: a) modula pohrane (G') i gubitka (G'') o (γ) smičnoj deformaciji, b) modula pohrane (G') i gubitka (G'') o kutnoj frekvenciji (ω) za otopine na bazi pululana i proteina konoplje.

U Tablicama 49 i 50 priložene su numeričke vrijednosti modula pohrane (G'), modula gubitka (G'') i faktora gubitka ($\tan \delta$) dobivenih testom frekvencije za uzorke PUL:ZE te PUL:PK, a kojima je kvantitativno potvrđena modifikacija viskoelastičnih svojstava uvođenjem zeina i proteina konoplje u otopinu pululana.

Tablica 49. Rezultati modula pohrane (G'), modula gubitka (G'') i faktora gubitka ($\tan \delta$) za polimerne otopine na bazi pululana i zeina

| Uzorak | G'_{LVE} (Pa) | G''_{LVE} (Pa) | $\tan \delta_{LVE}$ |
|------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 15PUL | 4,63±0,10 ^a | 36,90±0,10 ^a | 7,97±0,16 |
| 15PUL+lec | 9,70±0,68 ^{ab} | 47,77±1,65 ^{ab} | 4,94±0,18 |
| 80PUL:20ZE | 18,73±4,02 ^{ac} | 44,00±8,15 ^{abc} | 2,37±0,07 |
| 70PUL:30ZE | 47,03±1,81 ^d | 81,68±2,05 ^d | 1,74±0,02 |
| 60PUL:40ZE | 54,22±0,35 ^{de} | 57,82±0,78 ^{abcde} | 1,07±0,01 ^a |
| 50PUL:50ZE | 52,29±8,46 ^{def} | 41,12±6,92 ^{abef} | 0,79±0,01 ^{ab} |
| 40PUL:60ZE | 43,57±1,62 ^{defg} | 30,68±1,35 ^{abcfg} | 0,70±0,01 ^{abc} |
| 30PUL:70ZE | 43,57±4,62 ^{defgh} | 30,68±1,35 ^{abcfgh} | 0,70±0,01 ^{abcd} |
| 20PUL:80ZE | 138,43±0,16 | 52,91±0,44 ^{abcefg} | 0,38±0,00 ^{bcdef} |
| 15ZE | 32,60±1,66 ^{bcdefgh} | 12,15±0,17 ^{gh} | 0,37±0,01 ^{bcdef} |
| 15ZE+lec | 696,91±10,09 | 137,60±9,19 | 0,20±0,02 ^f |

Parametri G' , G'' i $\tan \delta$ su izmjereni pri 10 rad s⁻¹; Statistička obrada podataka provedena je pomoću analize jednosmjerne varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom u stupcu nisu statistički značajno različite ($p>0,05$).

Tablica 50. Rezultati modula pohrane (G'), modula gubitka (G'') i faktora gubitka ($\tan \delta$) za polimerne otopine na bazi pululana i proteina konoplje

| Uzorak | G'_{LVE} (Pa) | G''_{LVE} (Pa) | $\tan \delta_{LVE}$ |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 10PUL | / | / | / |
| 10PUL+lec | 1,07±0,11 ^a | 8,23±0,42 ^a | 7,73±0,40 |
| 80PUL:20PK | 3,48±0,48 ^{ab} | 11,48±0,90 ^a | 3,32±0,20 |
| 70PUL:30PK | 8,72±0,56 | 16,66±0,95 | 1,91±0,01 ^a |
| 60PUL:40PK | 4,66±0±47 ^b | 5,91±0,38 ^a | 1,28±0±05 ^{ab} |
| 50PUL:50PK | 41,30±0,56 | 32,16±0,47 | 0,78±0,00 ^b |
| 40PUL:60PK | 61,47±0,34 | 38,91±0,19 ^b | 0,63±0,01 ^b |
| 30PUL:70PK | 75,17±0,81 | 38,34±0,72 ^b | 0,51±0,00 ^b |

Parametri G' , G'' i $\tan \delta$ izmjereni su pri 10 rad s⁻¹; Statistička obrada podataka provedena je pomoću analize jednosmjerne varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom u stupcu nisu statistički značajno različite ($p>0,05$).

4.6.2. Fizikalna karakterizacija otopina nosača

Uz viskoznost (η), određeni su fizikalni parametri konduktivnosti (σ) i površinske napetosti (γ) (Tablica 51). Vrijednosti konduktivnosti i površinske napetosti ekstrakta u vodi ($2,02 \text{ mSI cm}^{-1}$, $36,19 \text{ mN m}^{-1}$) i zakiseljenog ekstrakta ($1,33 \text{ mSI cm}^{-1}$, $37,79 \text{ mN m}^{-1}$) u ledenoj octenoj kiselini (50 %, v/v) nisu se statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$). Vrijednosti konduktivnosti bile su u rangu od $1,51$ - $4,26 \text{ mSI cm}^{-1}$, dok je površinska napetost bila vrlo slična ili nešto niža u odnosu na korišteni ekstrakt ($40,84$ - $27,18 \text{ mSI cm}^{-1}$).

Tablica 51. Rezultati fizikalne karakterizacije otopina nosača za elektroispredanje

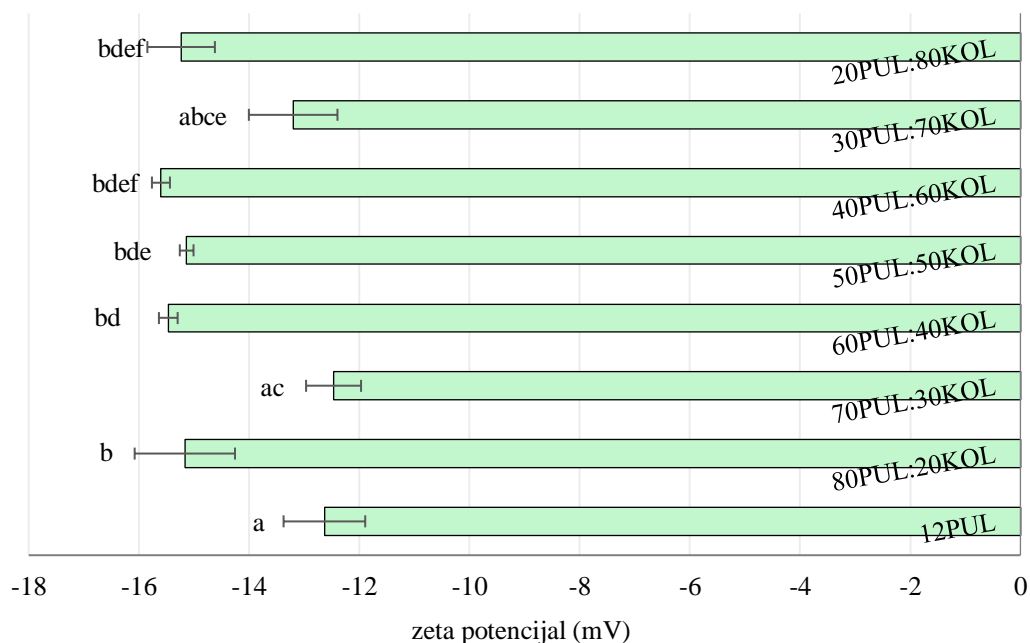
| Uzorak | σ (mSI cm ⁻¹) | γ (mN m ⁻¹) | η (mPa·s) ² |
|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| ekstrakt | 2,02±0,01 | 36,19±0,28 | zanemariva |
| zakiseljeni ekstrakt ¹ | 1,33±0,01 | 37,79±0,06 | zanemariva |
| pululan + hidrolizirani kolagen | | | |
| 12PUL | 2,71±0,02 | 36,69±1,20 ^{*a} | 425,82±0,56 |
| 80PUL:20KOL | 2,99±0,01 | 37,41±1,22 ^{*a} | 219,18±3,96 |
| 70PUL:30KOL | 3,17±0,00 | 36,70±0,86 ^{*a} | 158,08±5,26 |
| 60PUL:40KOL | 3,30±0,00 | 34,90±0,30 ^{*a} | 94,23±1,80 |
| 50PUL:50KOL | 3,42±0,01 | 35,38±0,88 ^{*a} | 55,46±1,59 |
| 40PUL:60KOL | 3,70±0,02 | 36,15±0,70 ^{*a} | 39,30±0,65 |
| 30PUL:70KOL | 4,17±0,02 ^a | 36,17±0,94 ^{*a} | 18,45±0,30 ^a |
| 20PUL:80KOL | 4,13±0,02 ^a | 36,90±0,43 ^{*a} | 11,57±0,73 ^{ab} |
| 12KOL | 4,26±0,02 | 37,28±0,77 ^{*a} | 2,70±0,12 ^b |
| pululan + zein | | | |
| 15PUL | 1,51±0,01 ^a | 35,11±0,84 ^a | 4129,55±12,85 |
| 15PUL+lec | 1,79±0,00 ^b | 24,62±0,23 ^b | 6169,65±18,75 ^a |
| 80PUL:20ZE | 1,67±0,03 ^c | 30,38±0,40 ^c | 3367,55±8,05 ^b |
| 70PUL:30ZE | 1,65±0,01 ^{cd} | 31,39±0,95 ^{cd} | 2645,9±8,6 ^c |
| 60PUL:40ZE | 1,57±0,01 ^{acd} | 31,49±1,08 ^{cde} | 2405,15±61,15 ^{cd} |
| 50PUL:50ZE | 1,91±0,01 ^{be} | 31,23±0,40 ^{cde} | 2525,95±49,55 ^{cde} |
| 40PUL:60ZE | 1,94±0,00 ^e | 34,72±1,20 ^a | 2749,4±39,7 ^{bcd} |
| 30PUL:70ZE | 1,82±0,00 ^{be} | 42,03±1,45 ^f | 7362,25±10,05 ^f |
| 20PUL:80ZE | 2,36±0,06 | 40,84±2,82 ^{**g} | 7075,3±71,2 ^f |
| 15ZE | 2,53±0,10 | 27,18±0,48 ^b | 665±18,8 |
| 15ZE+lec | 2,78±0,03 | 39,88±0,24 ^{**fg} | 5955,5±31,25 ^a |
| pululan + proteini konoplje | | | |
| 10PUL | 1,83±0,00 | 37,12±0,31 ^{**} | 469,82±3,79 |
| 10PUL+lec | 2,10±0,05 ^a | 27,99±0,15 ^a | 821,74±5,49 |
| 80PUL:20PK | 1,46±0,01 | 28,10±0,55 ^{ab} | 1486,60±19,20 ^a |
| 70PUL:30PK | 1,75±0,02 | 28,75±0,51 ^{abc} | 1612,60±12,40 ^a |
| 60PUL:40PK | 1,91±0,01 ^b | 28,91±0,08 ^{abcd} | 2109,10±23,20 |
| 50PUL:50PK | 1,94±0,01 ^b | 30,80±0,79 ^{de} | 1867,35±2,05 |
| 40PUL:60PK | 2,08±0,01 ^a | 32,40±0,38 ^{**ef} | 2768,90±83,10 |
| 30PUL:70PK | 2,22±0,01 | 33,60±1,34 ^f | 3447,40±0,50 |

¹ledena octena kiselina, 50% (v/v); ² izmjerena pri 12 s^{-1} . Statistička obrada provedena je za svaku fizikalnu veličinu unutar svakog seta polimernih otopina (PUL:KOL, PUL:ZE, PUL:PK) pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post-hoc test. Vrijednosti označene istim slovima ili znakom unutar svakog seta polimernih otopina za svaku fizikalnu veličinu nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). * =ekstrakt ** =zakiseljeni ekstrakt.

4.6.3. Karakterizacija nanovlakana

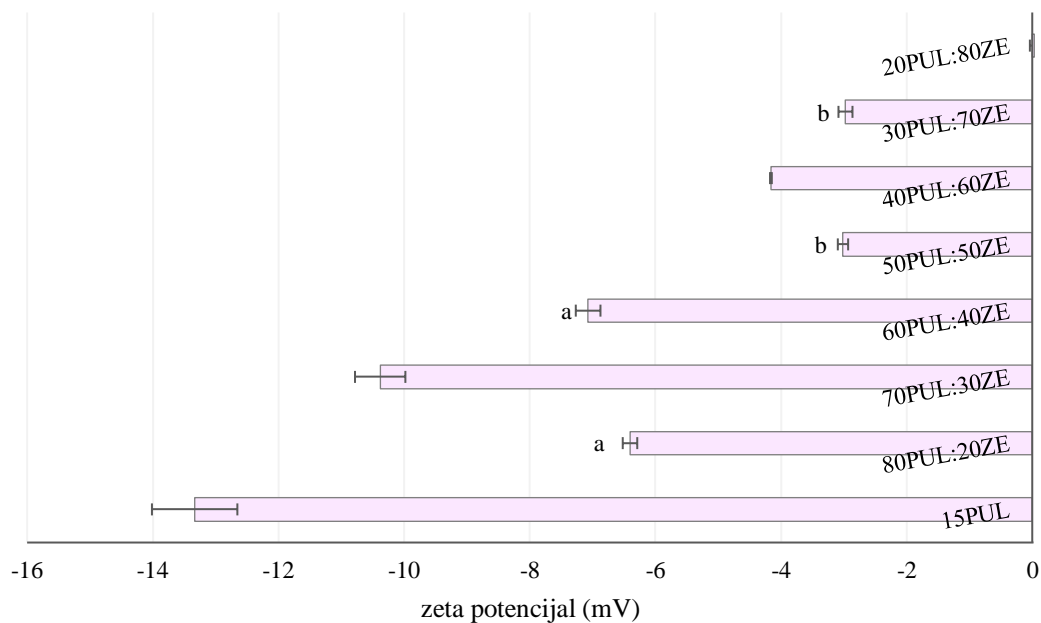
4.6.3.1. Fizikalni parametri inkapsulata

U svrhu određivanja potencijalne stabilnosti koloidnih disperzija formuliranih nanovlakana, izmjeren je zeta potencijal. Na Slici 49a-c prikazane su dobivene vrijednosti za sve PUL:KOL, PUL:ZE i PUL:PK inkapsulate pri čemu je vidljivo da su sva tri seta polimernih otopina rezultirala relativno niskim do nepostojećim zeta potencijalom koji je za uzorke PUL:KOL, PUL:ZE te PUL:PK iznosio redom: od -12,63 do -15,60 mV, od 0,03 do -13,33 mV te od -5,88 do -15,67. Odsutnost zeta potencijala detektirana je samo kod uzorka s najvećim udjelom zeina (20PUL:80ZE: 0,03 mV).



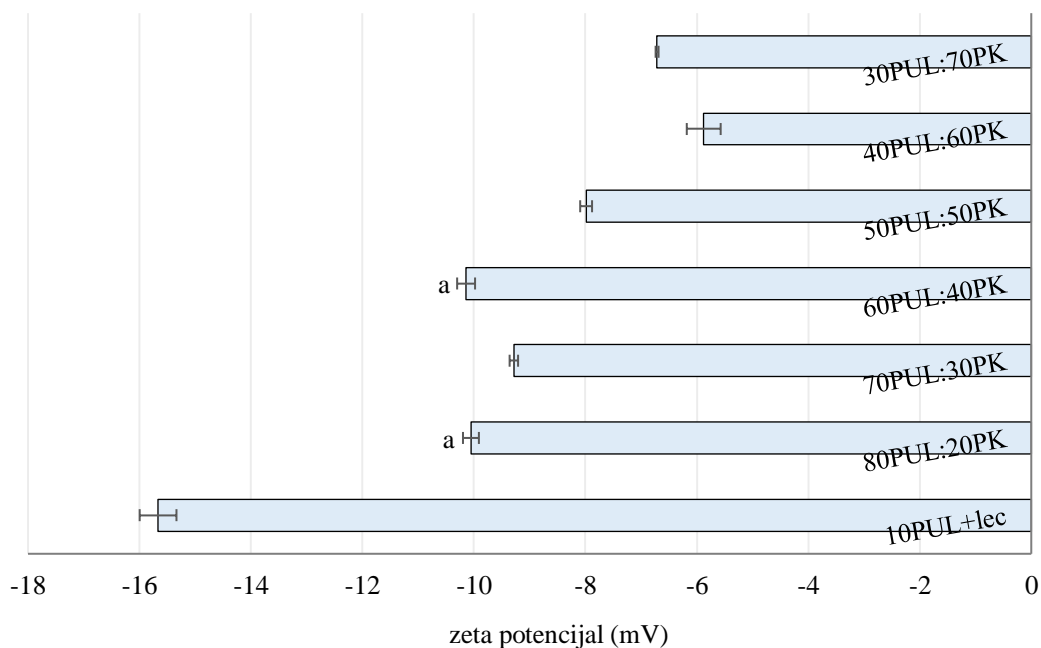
a)

Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$).



b)

Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$).



c)

Statistička obrada podataka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey kao posthoc test. Vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$).

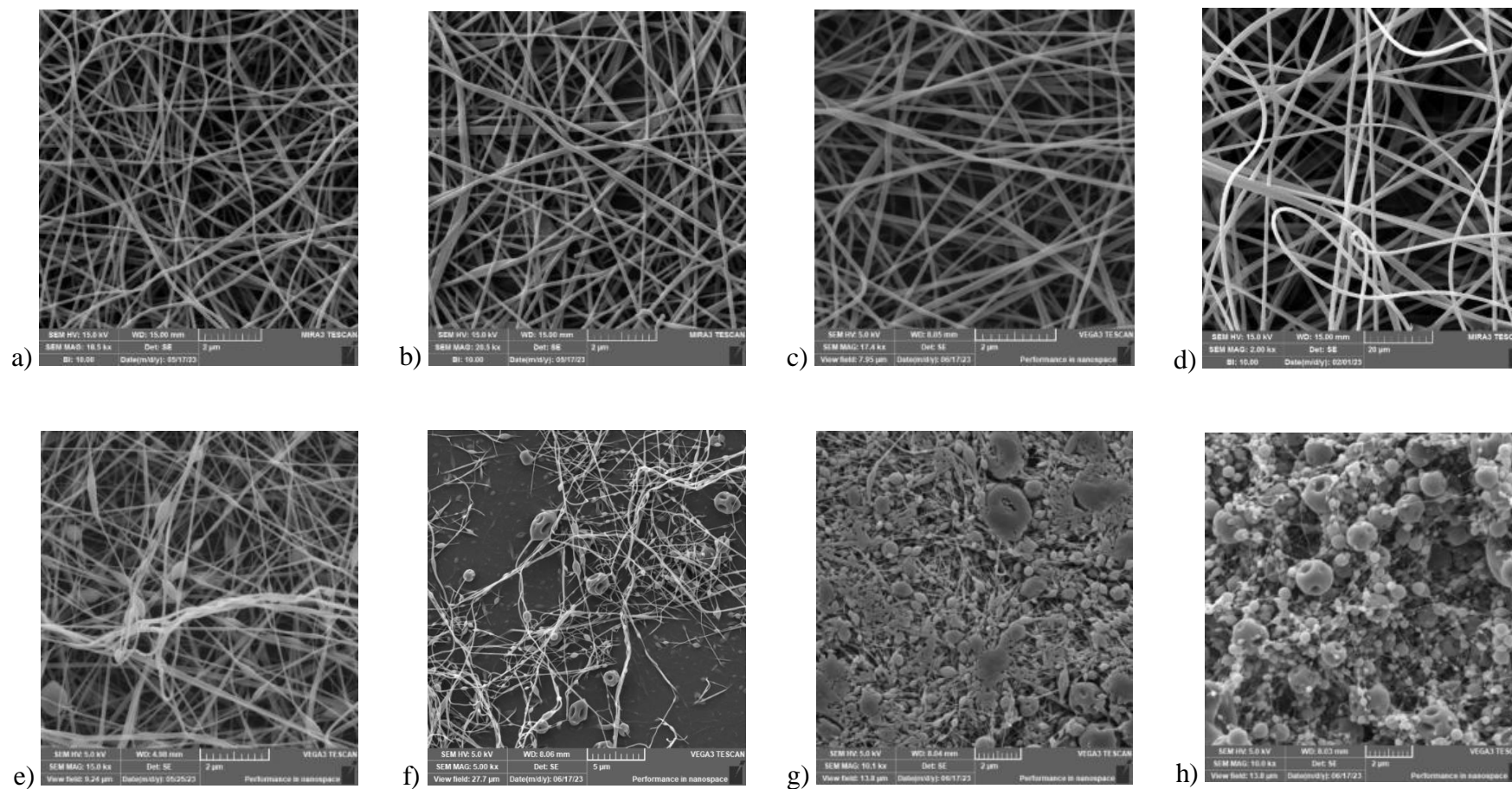
Slika 49. Rezultati zeta potencijala za nanovlakna na bazi: a) pululana i hidroliziranog kolagena, b) pululana i zeina, c) pululana i proteina konoplje.

SEM mikrografije inkapsulacijskih sustava na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, pululana i zeina te pululana i proteina konoplje prikazane su na Slikama 50a-h, 51a-h, te 52a-g.

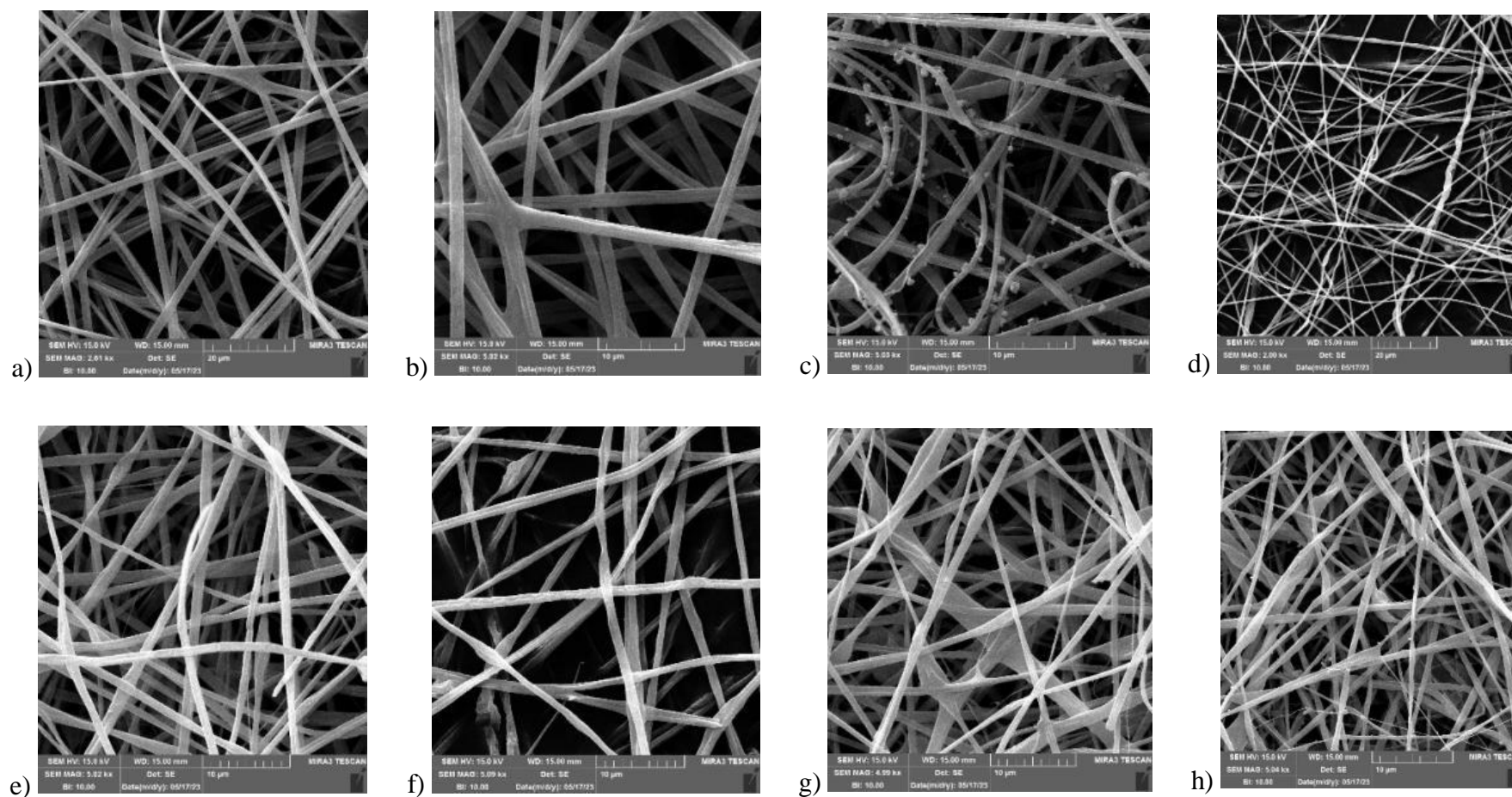
Kod formuliranih PUL:KOL inkapsulata, vidljivo je da su polimerni sustavi 12PUL, 80PUL:20KOL, 70PUL:30KOL i 60PUL:40KOL rezultirali nanovlaknima pravilne morfologije, dok su kod uzorka 50PUL:50KOL prisutna djelomično vretenasta zadebljanja i mikročestice unutar strukture nanovlakana. Premda je proces elektroispredanja preostalih kombinacija izgledao vizualno uspješan, SEM mikrografije ukazuju da je kod uzoraka 40PUL:60KOL i 30PUL:70KOL, umjesto nanovlakana, došlo do formiranja čestica i struktura nalik nanovlaknima, međusobno integriranih u jednu strukturu kod 30PUL:70KOL, dok je kod formulacije 20PUL:80KOL došlo do generiranja nano/mikročestica.

Kod formuliranih PUL:ZE inkapsulata, vidljivo je da su sve formulacije, neovisno o udjelu ZE, rezultirale uspješno proizvedenim nanovlaknima, pravilnih struktura i unakrsne orijentacije. Dodatno, kod uzoraka 30PUL:70ZE i 20PUL:80ZE može se uočiti manje uniformna struktura, sa mjestimičnom pojavom stanjenih ili zadebljanih dijelova u samoj strukturi. Prisutnost nanočestica na strukturama nanovlakana kod uzorka 70PUL:30ZE može se objasniti kratkotrajnom destabilizacijom polimernog mlaza tijekom vremenski dugog procesa elektroispredanja pomoću sustava igle, a prilikom kojeg je došlo do nedovoljno brzog isparavanja otapala pri čemu su se formirale globule/čestice nepotpuno elektroispredane otopine.

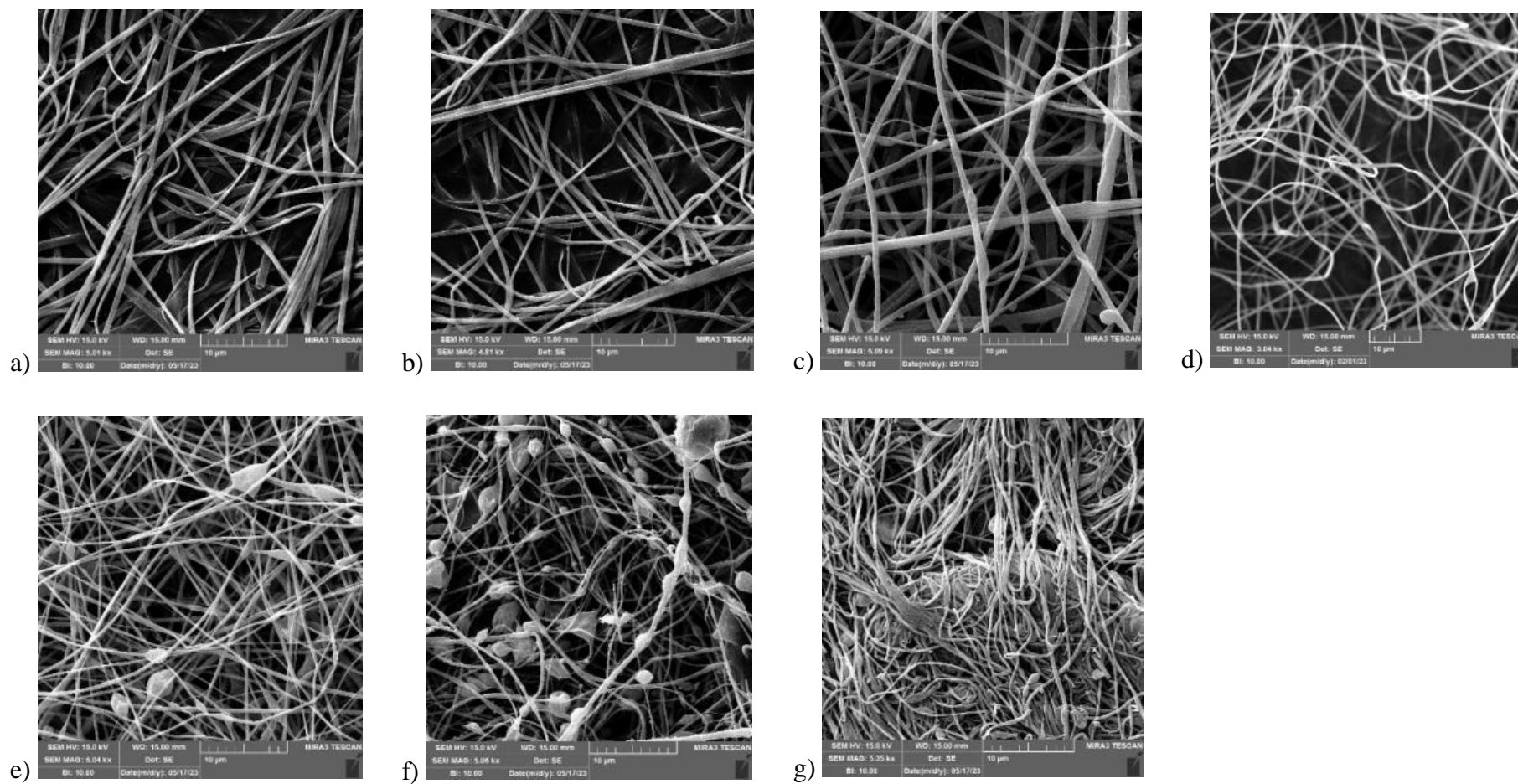
SEM mikrografije PUL:PK formulacija upućuju na uspješnost primjene elektroispredanja u formiranju nanovlakana kao inkapsuliranih doziranih sustava za ekstrakt trave ive. Kombinacije 10PUL+lec, 80PUL:20PK, 70PUL:30PK, 60PUL:40PK, ali i 30PUL:70PK rezultirale su najprikladnijom, vrlo uniformnom strukturom nanovlakana. Kod uzoraka 50PUL:50PK i 40PUL:60PK došlo je do značajnog deformiranja strukture u vidu formiranja globula polimerne otopine, mjestimičnih vretenastih struktura i generiranja nanovlakana značajno različitih promjera.



Slika 50. SEM mikrografije nanovlakana na bazi pululana i hidroliziranog kolagena: a) 12PUL, b) 80PUL:20KOL, c) 70PUL:30KOL, d) 60PUL:40KOL, e) 50PUL:50KOL, f) 40PUL:60KOL, g) 30PUL:70KOL, h) 20PUL:80KOL.



Slika 51. SEM mikrografije nanovlakana na bazi pululana i zeina: a) 15PUL, b) 80PUL:20ZE, c) 70PUL:30ZE, d) 60PUL:40ZE, e) 50PUL:50ZE, f) 40PUL:60ZE, g) 30PUL:70ZE, h) 20PUL:80ZE.



Slika 52. SEM mikrografije nanovlakana na bazi pululana i proteina konoplje: a) 10PUL+lec, b) 80PUL:20PK, c) 70PUL:30PK, d) 60PUL:40PK, e) 50PUL:50PK, f) 40PUL:60PK, g) 30PUL:70PK.

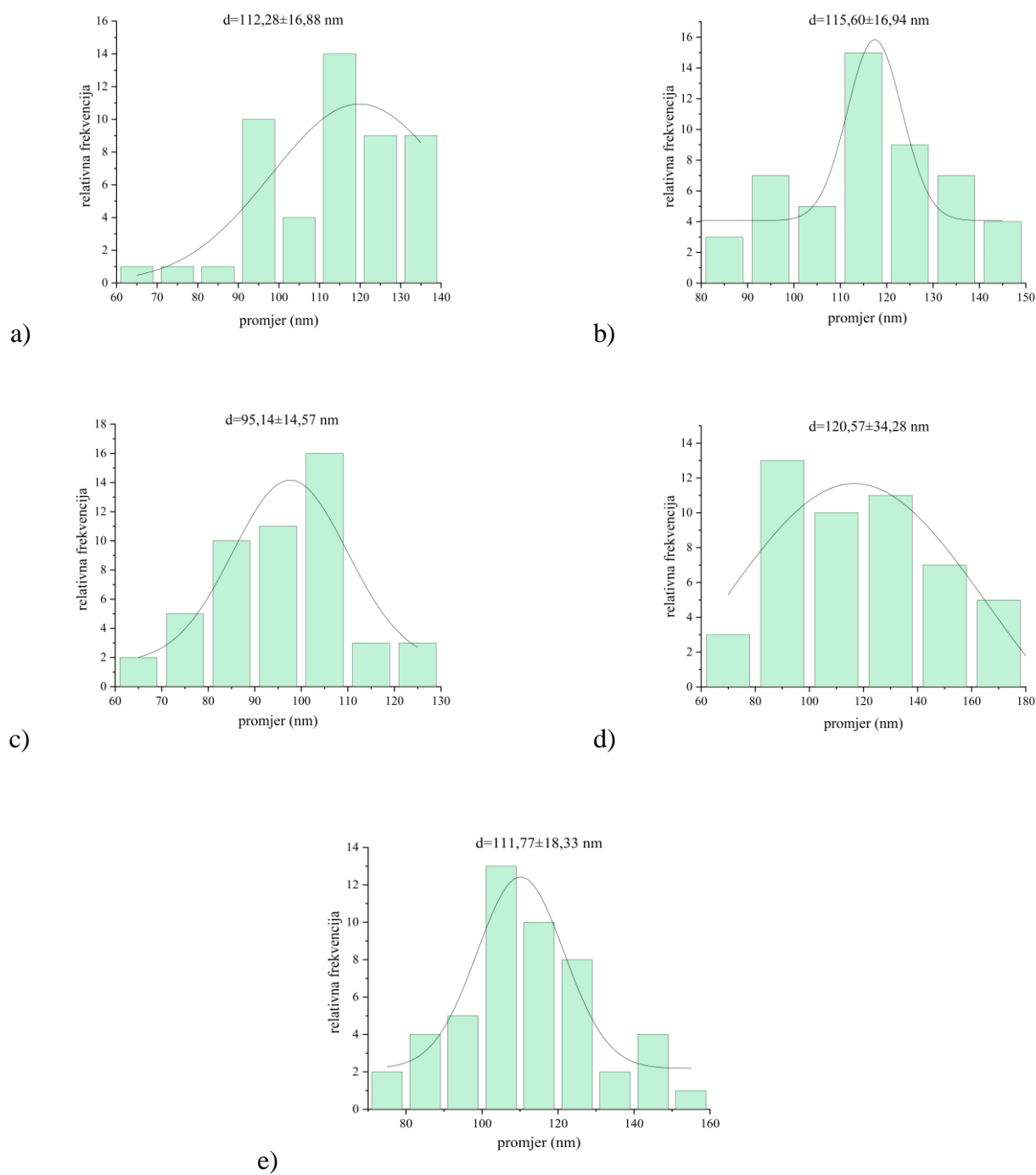
U sklopu morfološke karakterizacije formuliranih nanovlakana, određena je i relativna distribucija promjera nanovlakana, analizom pripadajućih SEM mikrografija. Određen je i prosječan promjer izmjerenih nanovlakana za svaki set inkapsulata.

Prema Slici 53a-h vidljivo je da sve PUL:KOL formulacije imaju relativno sličan prosječan promjer nanovlakana, a koji se kretao od 95,14 nm (12PUL) do 120,57 nm (60PUL:40KOL). Najšira distribucija uočena je kod formulacija 12 PUL i 20PUL:80KOL.

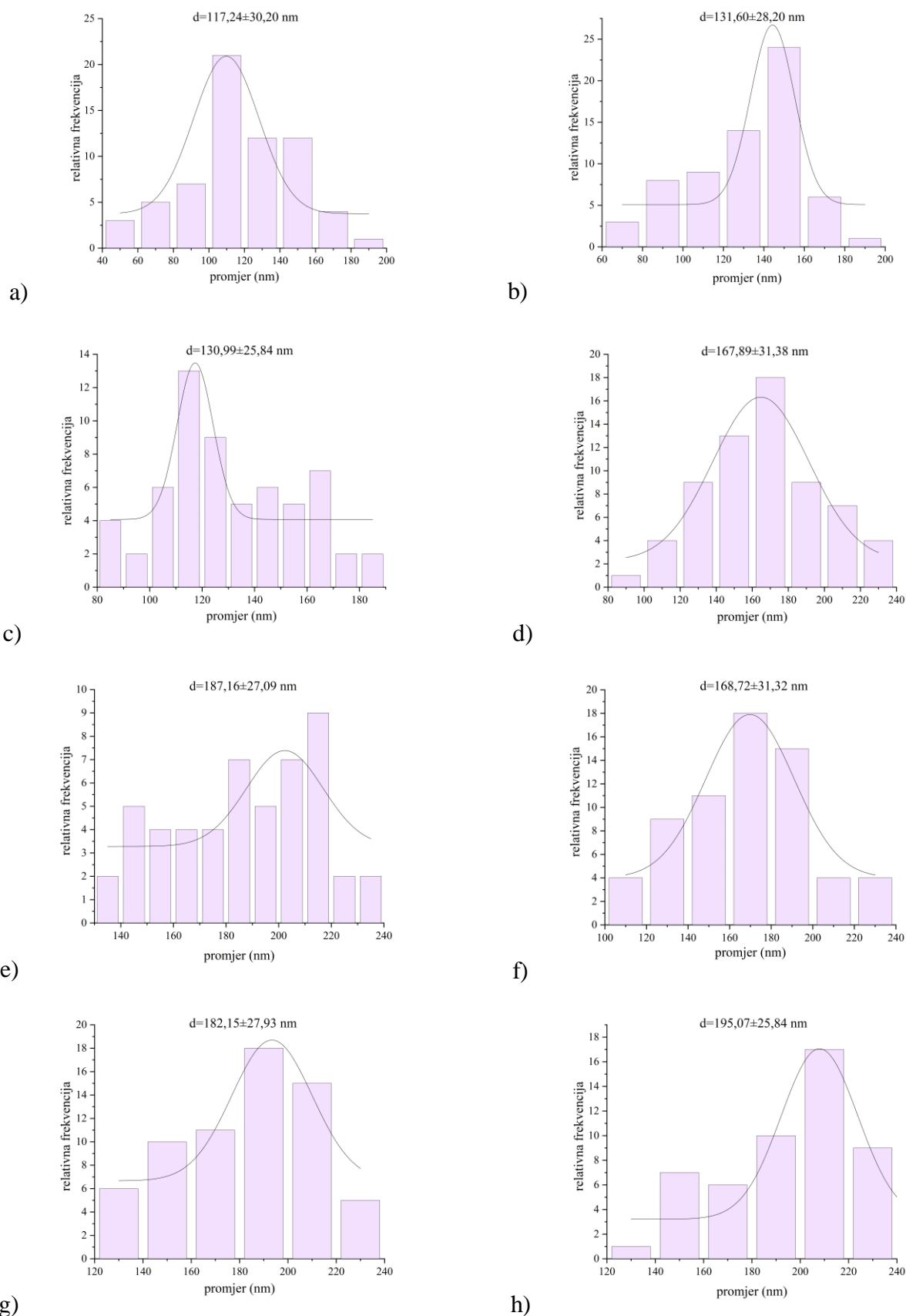
Formulacije PUL:ZE rezultirale su većim prosječnim promjerom u odnosu na PUL:KOL kombinacije, u rasponu od 117,24 nm (15PUL) do 195,07 nm (20PUL:80ZE). Formulacije 70PUL:30ZE i 50PUL:50ZE rezultirale su nanovlaknima najšireg raspona izmjerenih promjera, dok je uzorak 20PUL:80ZE imao najmanju distribuciju promjera (Slika 54 a-h).

Formulacije PUL:PK imale su slične relativne distribucije promjera nanovlakana kao i kod PUL:ZE uzoraka, a čiji je prosječan promjer bio u rasponu od 118,36 nm (70PUL:30PK) do 186,18 nm (30PUL:70PK). Kod svih ispitanih nanovlakana uočena je podjednaka relativna frekvencija izmjerenih promjera, osim kod 50PUL:50PK i 30PUL:70PK koji su pokazali najmanje varijacije (Slika 55a-g).

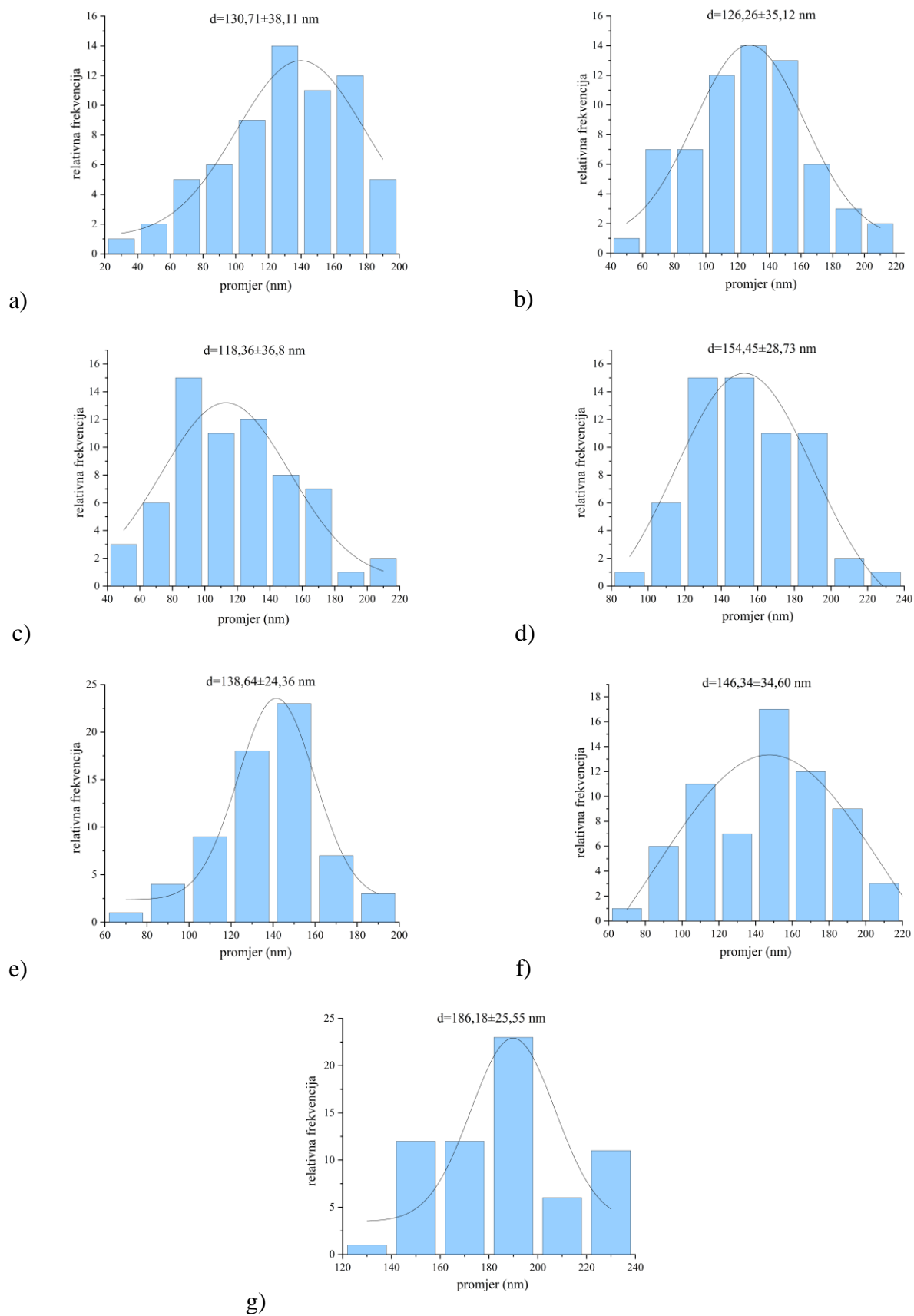
Dodatno, izmjereni prosječni promjeri uzoraka nanovlakana PUL:ZE te PUL:PK postavljeni su u korelaciju s bezdimenzijskim Ohnesorge-ovim brojem (Oh). Kod PUL:ZE nanovlakana (Slika 56), nije uočena značajna korelacija između prosječnog promjera i Oh -ovog broja ($R^2=0,38$), dok je kod PUL:PK nanovlakana (Slika 57) detektirano značajno povećanje prosječnog promjera u odnosu na povećani Oh broj ($R^2=0,86$). Nanovlakna PUL:KOL nisu promatrana u ovom kontekstu obzirom da se ovaj parametar koristi za karakterizaciju otopina viskoelastičnog karaktera.



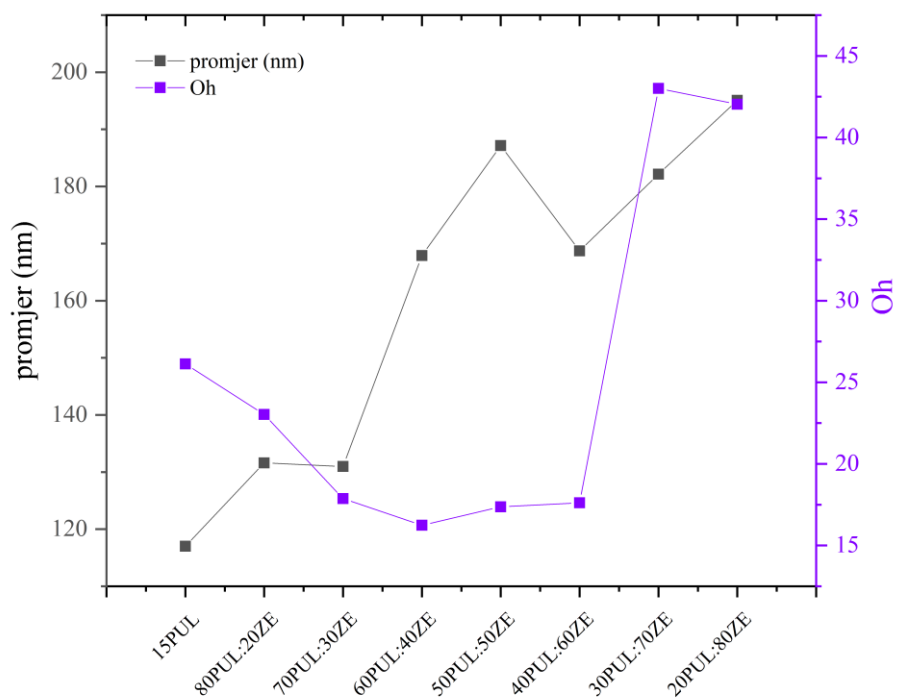
Slika 53. Relativna distribucija promjera nanovlakana na bazi pululana i hidroliziranog kolagena: a) 12PUL, b) 80PUL:20KOL, c) 70PUL:30KOL, d) 60PUL:40KOL, e) 50PUL:50KOL.



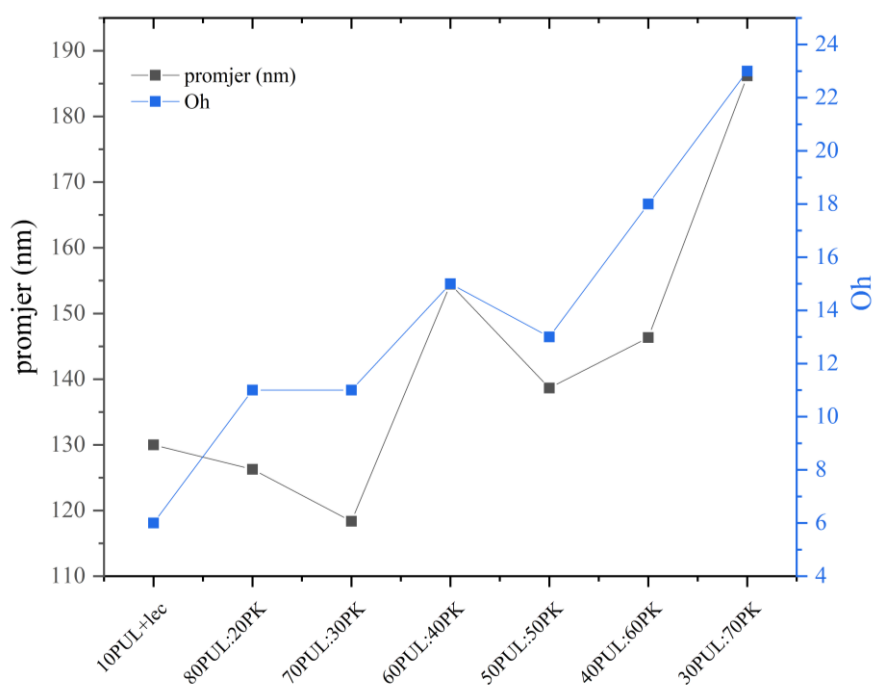
Slika 54. Relativna distribucija promjera nanovlakana na bazi pululana i zeina: a) 15PUL, b) 80PUL:20ZE, c) 70PUL:30ZE, d) 60PUL:40ZE, e) 50PUL:50ZE, f) 40PUL:60ZE, g) 30PUL:70ZE, h) 20PUL:80ZE.



Slika 55. Relativna distribucija promjera nanovlakana na bazi pululana i proteina konoplje: a) 10PUL+lec, b) 80PUL:20PK, c) 70PUL:30PK, d) 60PUL:40PK, e) 50PUL:50PK, f) 40PUL:60PK, g) 30PUL:70PK.



Slika 56. Odnos prosječnog promjera nanovlakana i Ohnesorge-ovog broja za nanovlakna na bazi pululana i zeina.

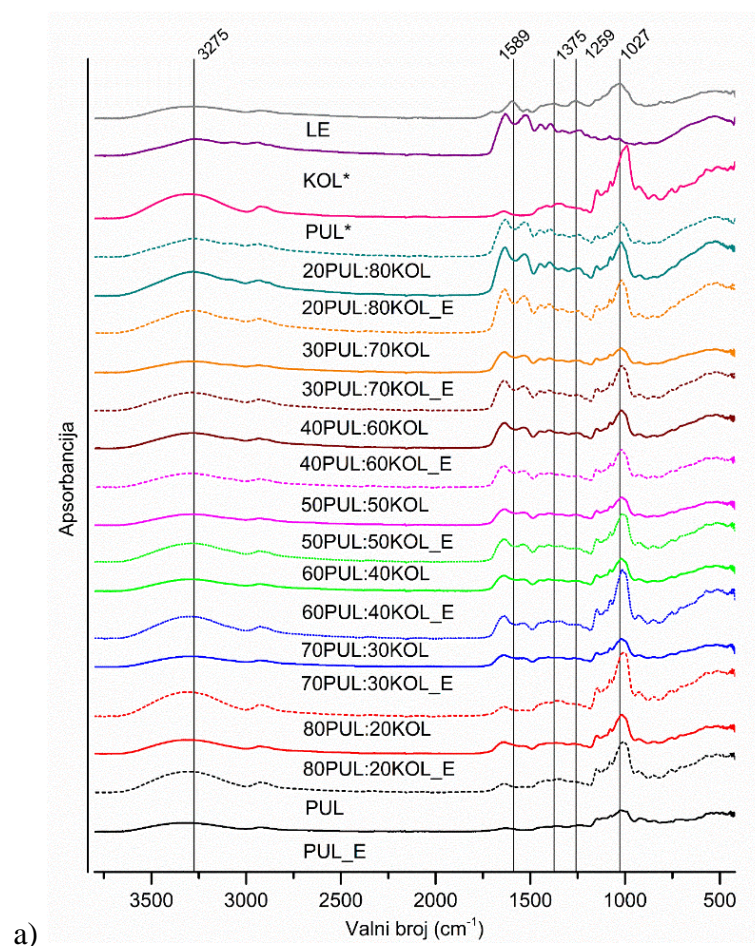


Slika 57. Odnos prosječnog promjera nanovlakana i Ohnesorge-ovog broja za nanovlakna na bazi pululana i proteina konoplje.

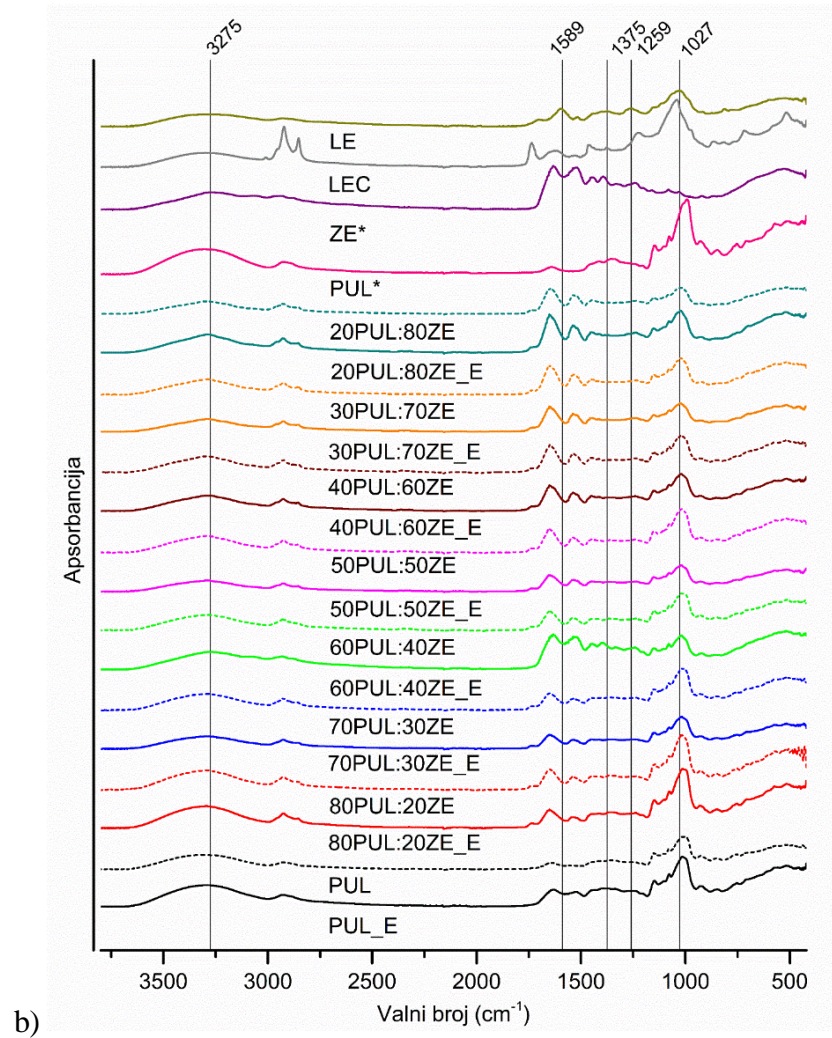
4.6.3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nosača i inkapsulata

Na Slici 58a-c, prikazani su dobiveni spektri za formulirana nanovlakna na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, pululana i zeina te pululana i proteina konoplje. U svrhu što realnije slike potencijalno formiranih nekovalentnih interakcija, na svakom spektru su prikazana nanovlakna s ekstraktom, nanovlakna bez ekstrakta, korišteni polimeri i liofilizirani ekstrakt te suncokretov lecitin kao ključan stabilizator binarnih polimernih sustava PUL:ZE i PUL:PK.

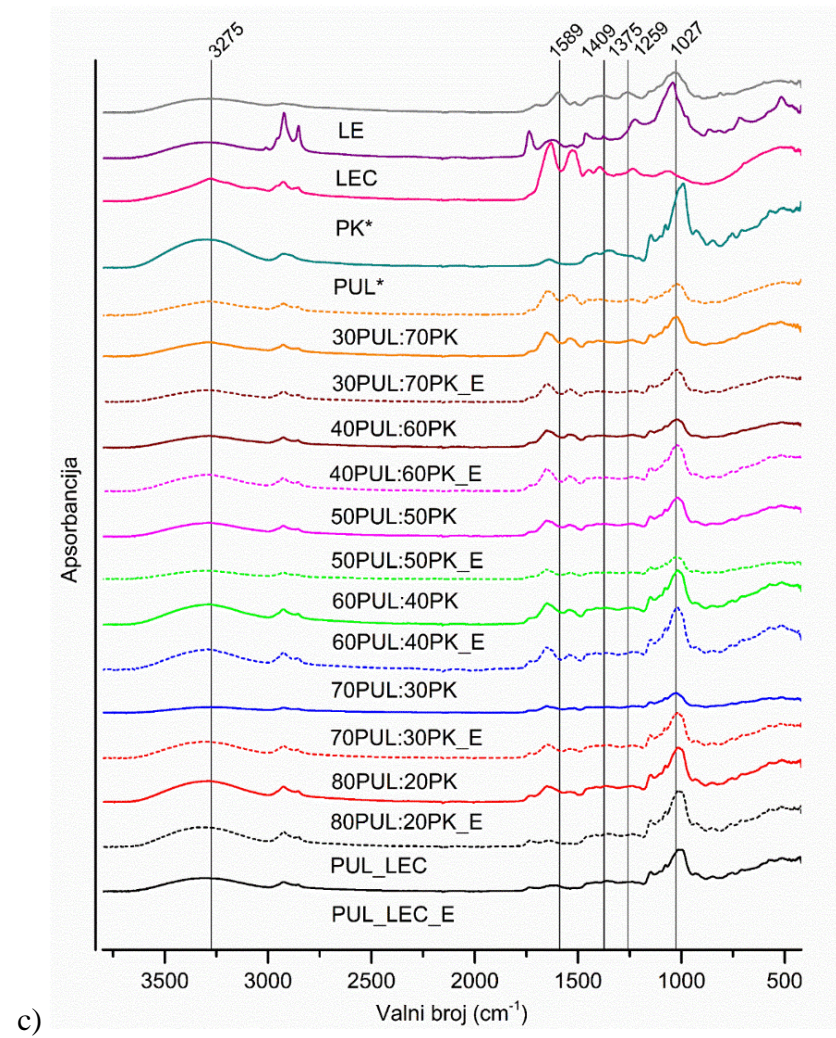
Obzirom na smanjenje intenziteta apsorpcijskih traka kod nanovlakana s ekstraktom u odnosu na nanovlakna bez ekstrakta kod svih ispitivanih uzoraka, može se zaključiti da je tijekom elektroispredanja došlo određenih interakcija. Također, povećanjem intenziteta apsorpcijskih vrpca, inače karakterističnih za suncokretov lecitin, potvrđen je značajan utjecaj ovog surfaktanata u formiranju stabilnih otopina.



LE=liofilizirani ekstrakt; KOL*=hidrolizirani kolagen; PUL*=pululan;
 PUL:KOL=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:KOL_E=nanovlakna s ekstraktom



LE=liofilizirani ekstrakt; LEC=suncokretov lecitin; ZE*=zein; PUL*=pululan;
 PUL:ZE=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:ZE_E=nanovlakna s ekstraktom

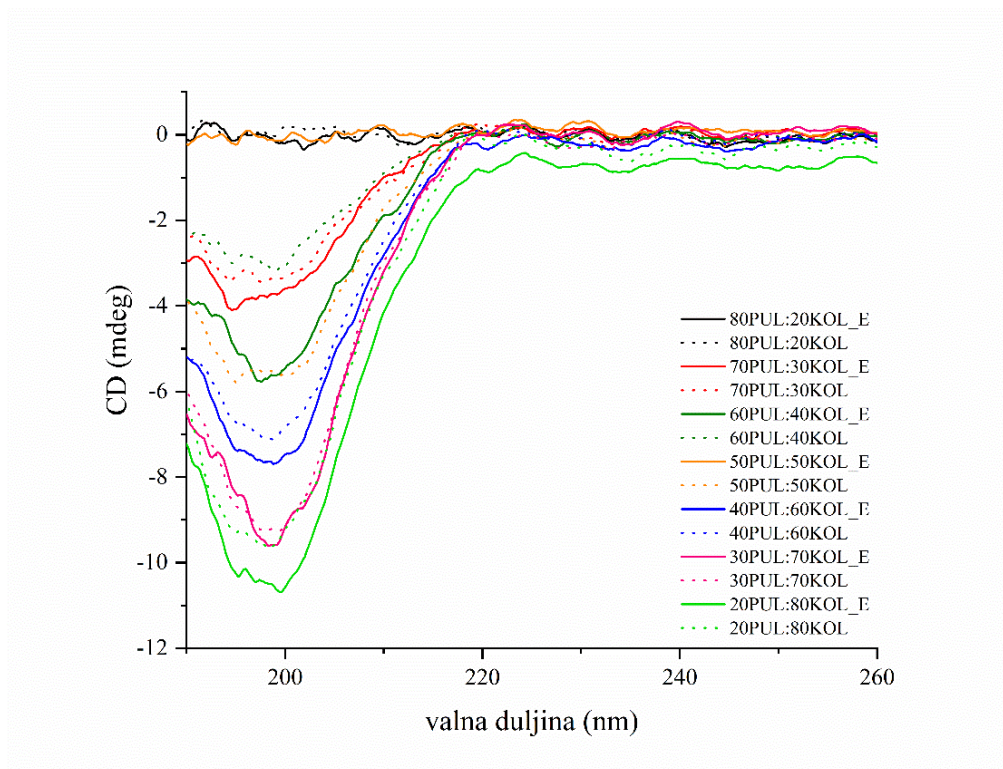


LE=liofilizirani ekstrakt; LEC=suncokretov lecitin; PK*=proteini konoplje;
 PUL*=pululan; PUL:PK=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:PK_E=nanovlakna
 s ekstraktom

Slika 58. ATR-FT-IR spektri nosača i nanovlakana na bazi: a) pululana i hidroliziranog kolagena, b) pululana i zeina i c) pululana i proteina konoplje.

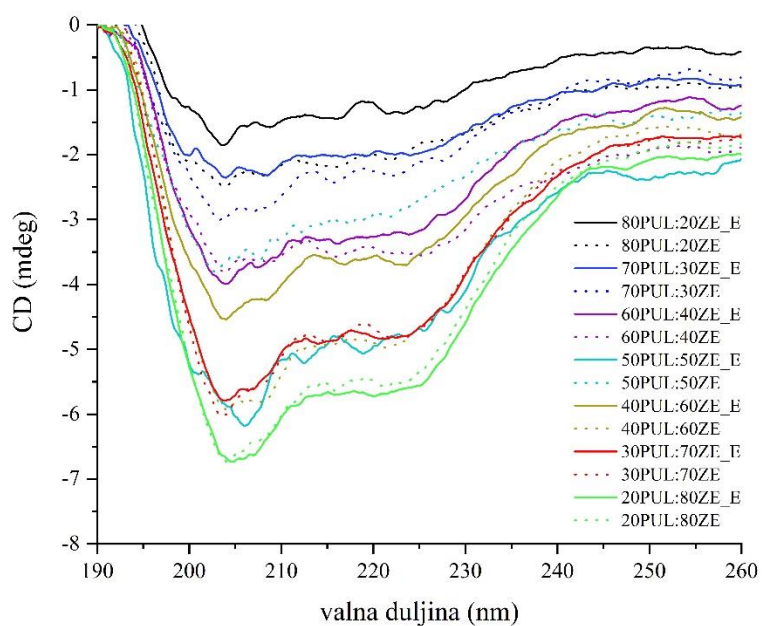
Uz ATR-FT-IR tehniku, u svrhu utvrđivanja promjene u sekundarnoj konformaciji proteina provedena je i analiza cirkularnog dikroizma za sve istraživane setove kombinacija polimernih otopina na bazi polisaharidnog, i izabranog proteinskog nosača. Ova analiza tako može poslužiti kao dodatna potvrda novoformiranih interakcija između funkcionalnih skupina komponenti ekstrakta i aminokiselina.

Dobiveni spektri cirkularnog dikroizma za sve formulacije na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, pululana i zeina te pululana i proteina konoplje prikazani su na Slikama 59, 60 i 61. Za prikladnu usporedbu, uz inkapsulirane sustave ekstrakta (označeni s _E), snimljena su i nanovlakna bez ekstrakta (označeni bez _E). Generalno, za svaki set inkapsulata utvrđena je promjena u sekundarnoj konformaciji hidroliziranog kolagena, zeina i proteina konoplje u vidu smanjenja, odnosno povećanja intenziteta cirkularno polarizirajućeg svjetla, ovisno o uzorku i u odnosu na nanovlakna bez ekstrakta. Kod uzoraka 30PUL:70KOL, 30PUL:70ZE, 20PUL:80ZE te 40PUL:60PK nije vidljiva promjena intenziteta apsorpcijskih vrpci.



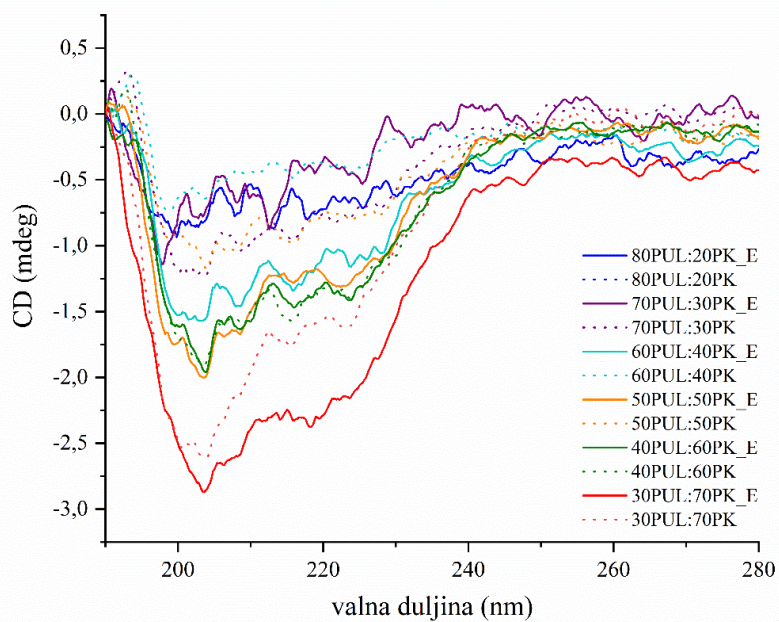
PUL:KOL=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:KOL_E=nanovlakna s ekstraktom

Slika 59. Spektri cirkularnog dikroizma za nanovlakna na bazi pululana i hidroliziranog kolagena.



PUL:ZE: nanovlakna bez ekstrakta; PUL:ZE_E: nanovlakna s ekstraktom

Slika 60. Spektri cirkularnog dikroizma za nanovlakna na bazi pululana i zeina.



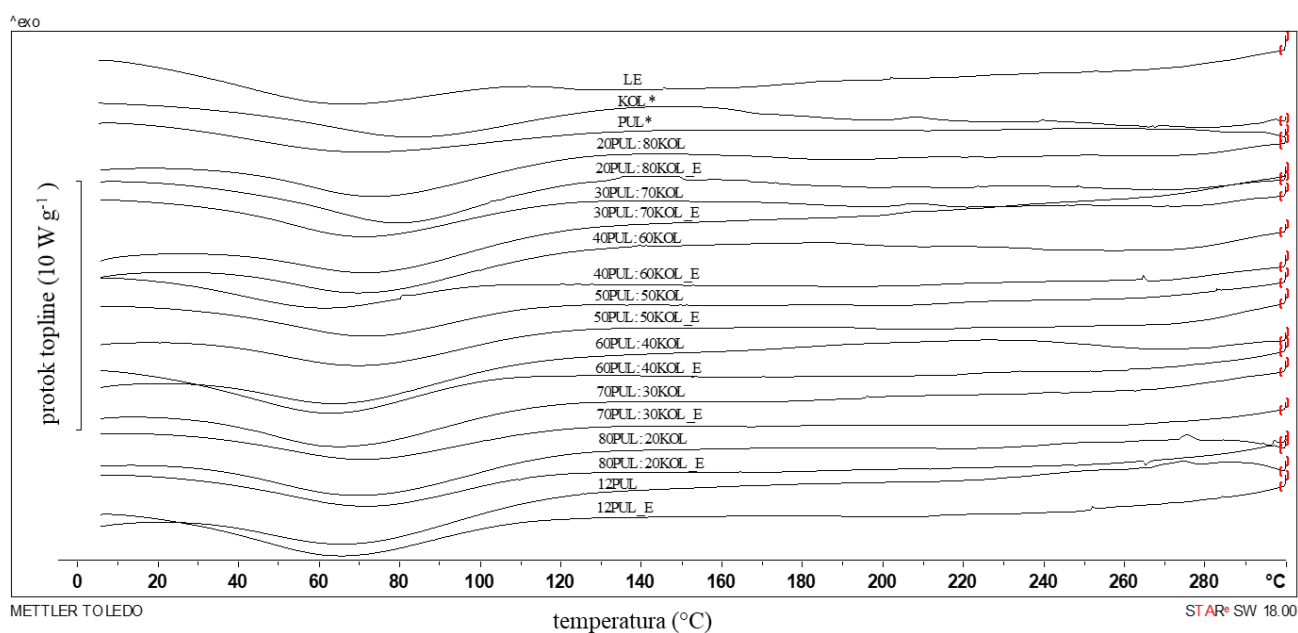
PUL:PK=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:PK_E=nanovlakna s ekstraktom

Slika 61. Spektri cirkularnog dikroizma za nanovlakna na bazi pululana i proteina konoplje.

4.6.3.3. Termogrami nosača i inkapsulata dobiveni razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)

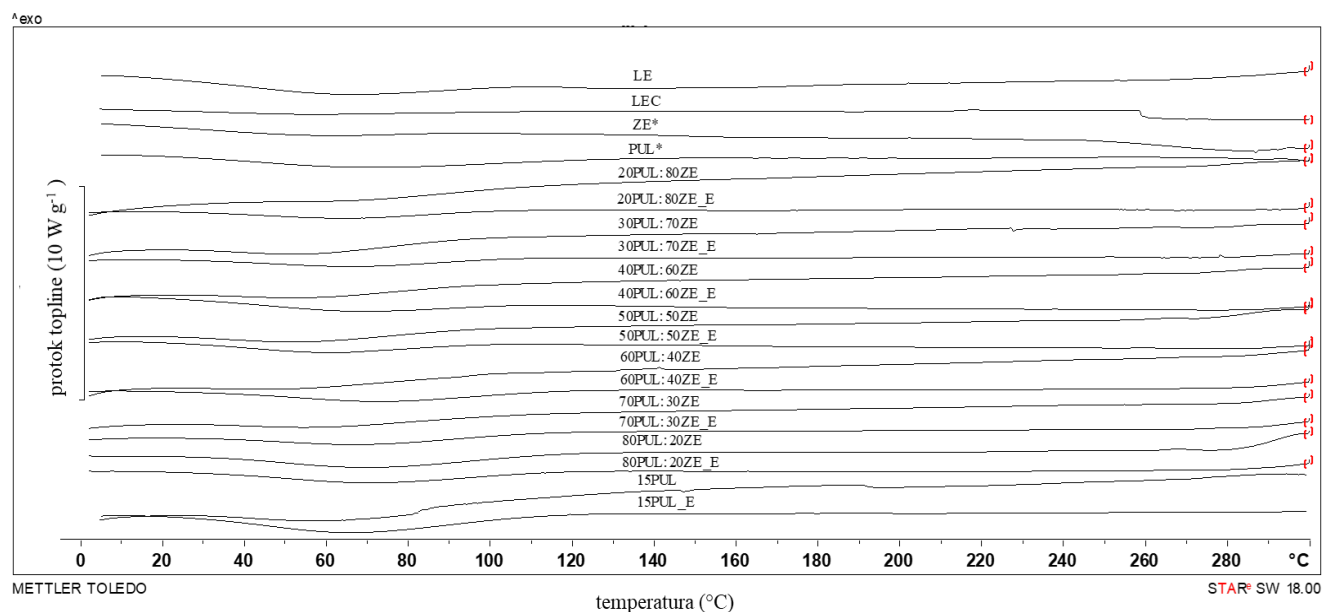
Na Slikama 62, 63 i 64 prikazani su DSC termogrami inkapsuliranih dozirnih sustava u formi nanovlakana formuliranih na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, pululana i zeina te pululana i proteina konoplje. Uz inkapsulate od interesa, na svakom termogramu prikazana su i nanovlakna polimernih kombinacija bez ekstrakta, a koja su prošla identičan eksperimentalni proces kao i nanovlakna s ekstraktom. Prikazani su i polimeri pululana, zeina i proteina konoplje te liofilizirani ekstrakt.

Na svim termogramima, neovisno o setu kombinacija polimernih nosača, nije detektiran niti jedan fazni prijelaz. Blagi pikovi detektirani u temperaturnom rasponu od 63-85 °C na Slici 62, te u rasponu od 56-75 °C na Slici 64, odgovaraju endotermnom procesu isparavanja vode.



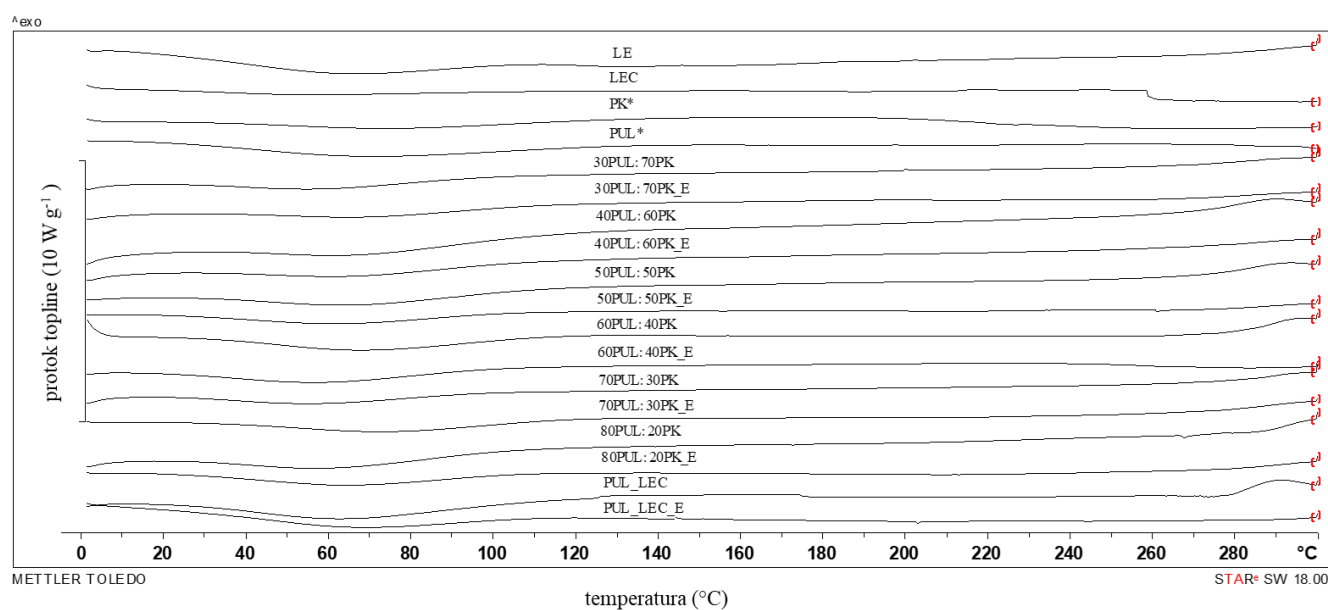
LE=liofilizirani ekstrakt; KOL*=hidrolizirani kolagen; PUL*=pululan; PUL:KOL=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:KOL_E=nanovlakna s ekstraktom

Slika 62. DSC termogrami korištenih nosača te nanovlakana na bazi pululana i hidroliziranog kolagena.



LE=liofilizirani ekstrakt; LEC=suncokretov lecitin; ZE*=zein; PUL*=pululan; PUL:ZE=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:ZE_E=nanovlakna s ekstraktom

Slika 63. DSC termogrami korištenih nosača te nanovlakana na bazi pululana i zeina.



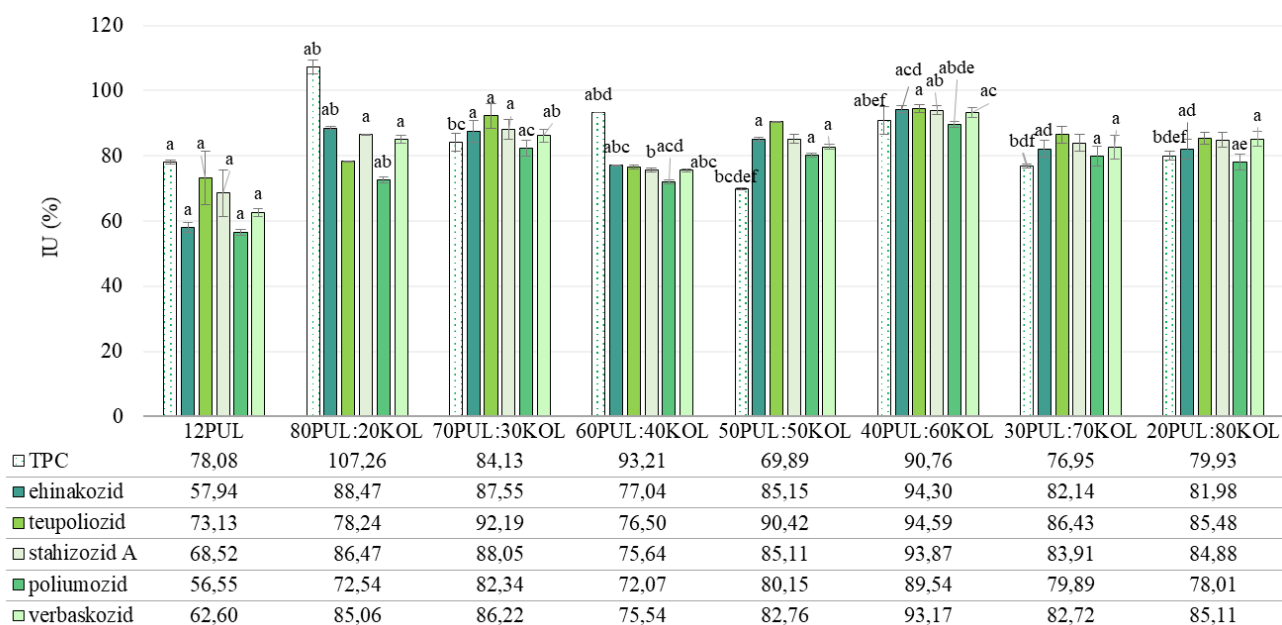
LE=liofilizirani ekstrakt; LEC=suncokretov lecitin; PK*=proteini konoplje; PUL*=pululan; PUL:PK=nanovlakna bez ekstrakta; PUL:PK_E=nanovlakna s ekstraktom

Slika 64. DSC termogrami korištenih nosača te nanovlakana na bazi pululana i proteina konoplje .

4.6.3.4. Bioaktivna svojstva inkapsulata

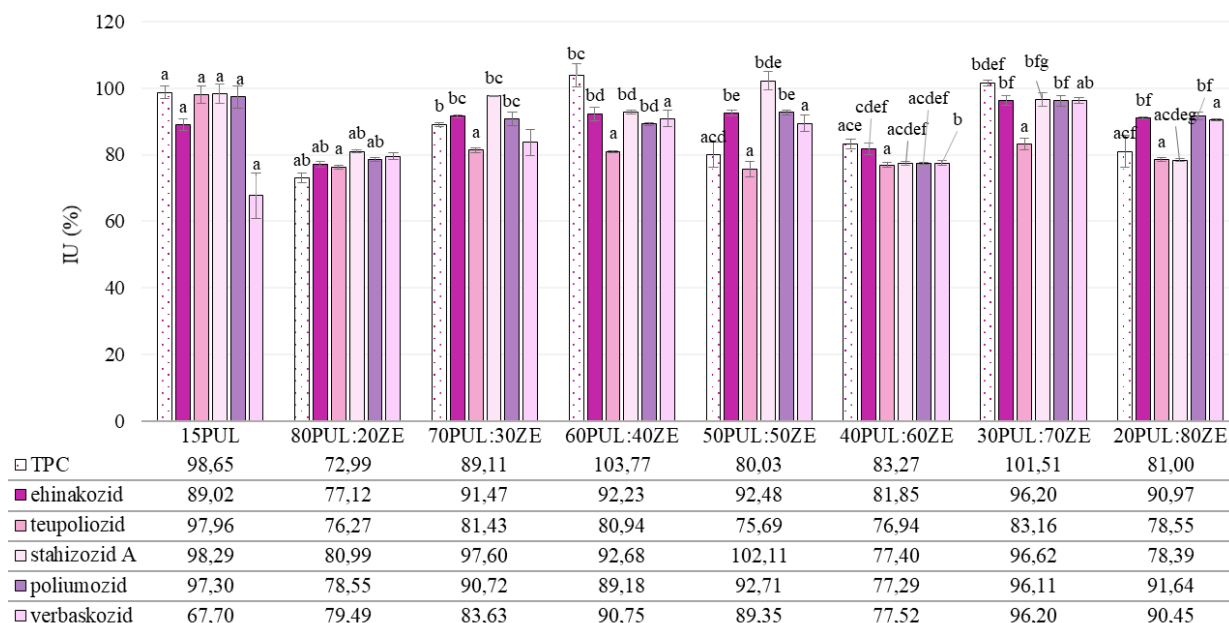
Inkapsulacijska učinkovitost određena je prema udjelu ukupnih polifenola i udjelu pojedinačnih feniletanoidnih glikozida u dobivenim inkapsulatima.

Na Slici 65 prikazani su rezultati inkapsulacijske učinkovitosti za nanovlakna na bazi pululana i hidroliziranog kolagena (PUL:KOL). Vrijednosti izmjereneog TPC-a bile su u rasponu od 69,89 % (50PUL:50KOL) do 107,26 % (80PUL:20KOL). Prema dobivenim rezultatima za pojedinačne udjele polifenola, najmanja inkapsulacijska učinkovitost detektirana je kod 12PUL za sve feniletanoidne glikozide (57,94-73,13 %), dok je 40PUL:60KOL rezultirao najvećom inkapsulacijskom učinkovitošću (89,54-94,56 %).



Statistička obrada provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post hoc test. Vrijednosti označene istim slovom su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Slika 65. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (TPC) i pojedinačnih polifenola za nanovlakna na bazi pululana i hidroliziranog kolagena.

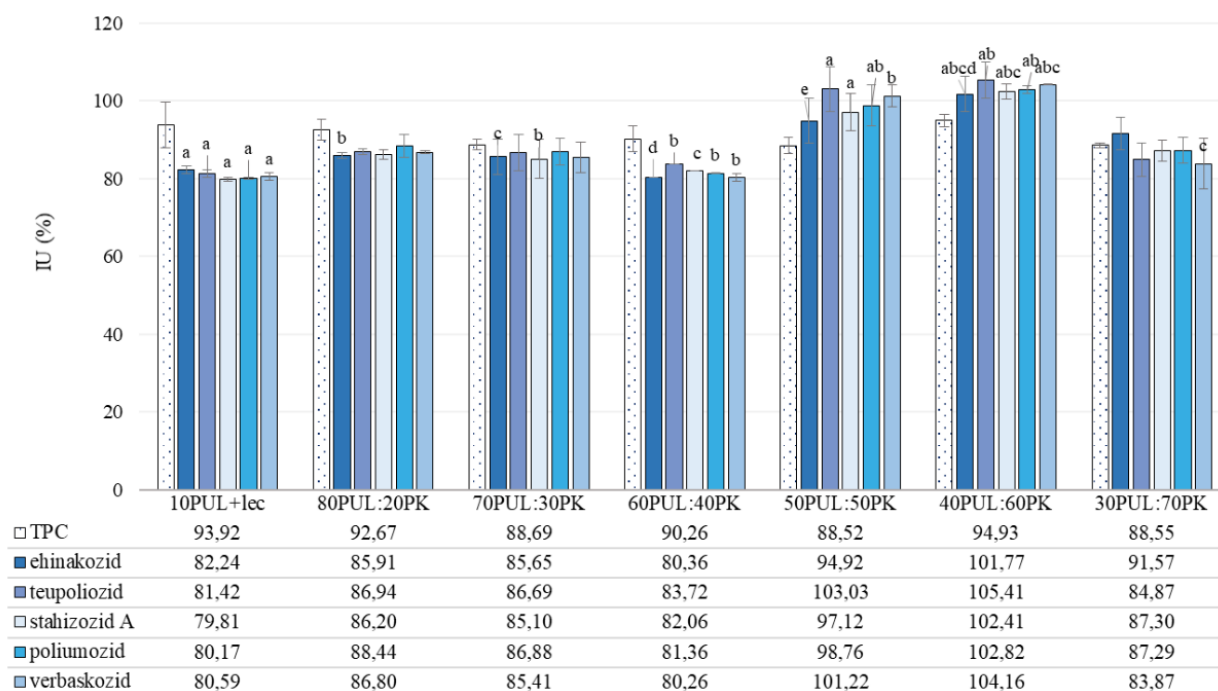


Statistička obrada provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post hoc test. Vrijednosti označene istim slovom su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Slika 66. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (TPC) i pojedinačnih polifenola za nanovlakna na bazi pululana i zeina.

Inkapsulacijski sustavi PUL:ZE (72,99-103,77 %) rezultirali su vrlo sličnom inkapsulacijskom učinkovitošću TPC-a u odnosu na PUL:KOL formulacije (Slika 66). Sve kombinacije nosača rezultirale su vrlo visokom inkapsulacijskom učinkovitošću ehinakozida, teupoliozida, poliumozida, stahizozida A i verbaskozida, pri čemu su najmanji udjeli skoro svih sastojaka određeni u uzorcima 80PUL:20ZE (76,27-80,99 %) i 40PUL:60ZE (76,94-81,85 %).

Formulacije na bazi pululana i proteina konoplje (PUL:PK) pokazale su se prikladnima za zadržavanje polifenola ekstrakta trave ive pri čemu su sve kombinacije rezultirale sličnim udjelima TPC-a (IU: 88,55-94,93 %). Kao najbolje kombinacije, s gotovo 100 %-tnom inkapsulacijskom učinkovitošću za sve feniletanoidne glikozide, pokazale su se 50PUL:50PK (94,62-103,03 %) i 40PUL:60PK (101,77-105,41 %) (Slika 67).



Statistička obrada provedena je jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post hoc test. Vrijednosti označene istim slovom su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

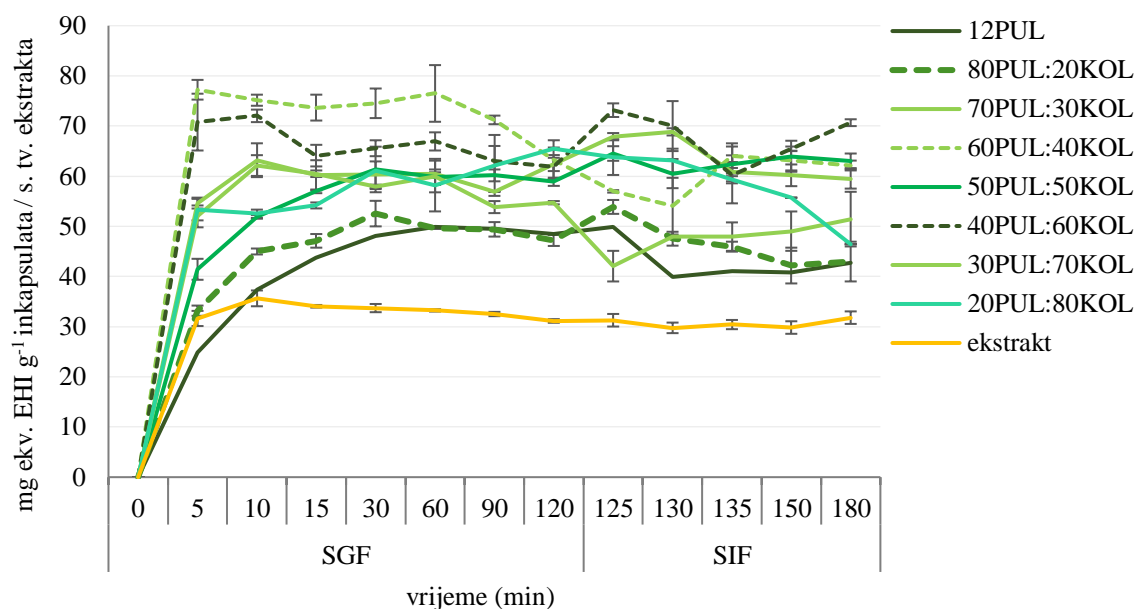
Slika 67. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (TPC) i pojedinačnih polifenola za nanovlakna na bazi pululana i proteina konoplje.

Na Slici 68a-c prikazani su rezultati *in vitro* digestije svih 23 formuliranih kombinacija inkapsuliranih sustava ekstrakta trave ive elektroispredanjem na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, pululana i zeina te pululana i proteina konoplje. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz dozirnih sustava praćena je određivanjem udjela ukupnih polifenola.

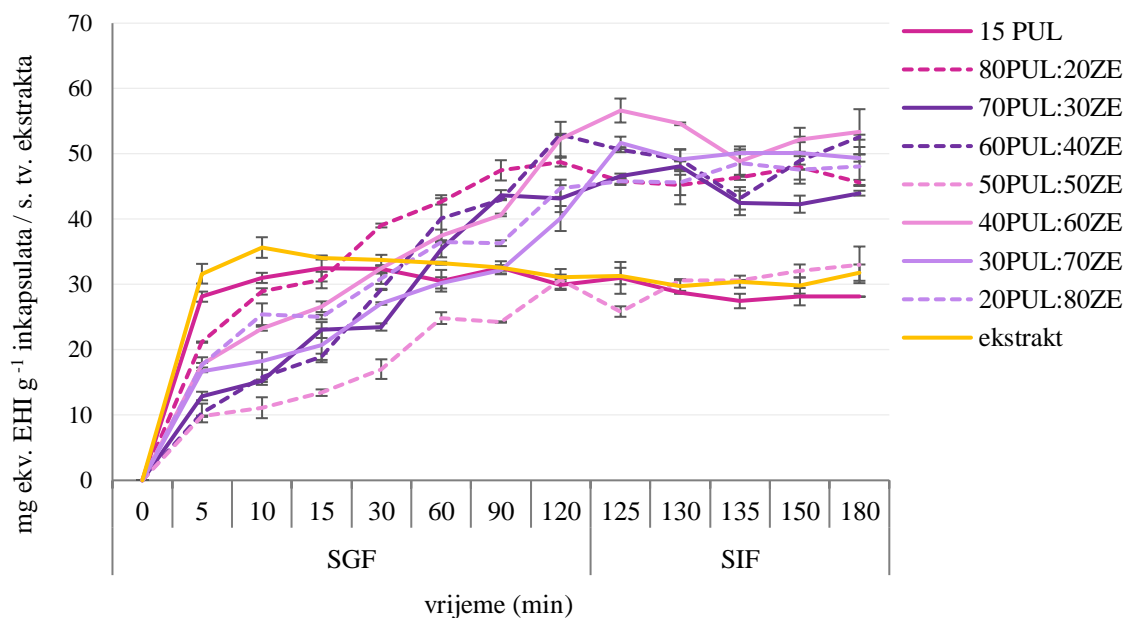
Kod PUL:KOL nanovlakana, primijećeno je gotovo trenutno otpuštanje polifenolnih spojeva, odnosno u prvih 5 minuta u simuliranoj želučanoj fazi (SGF) pri pH=3 iz dozirnih sustava 60PUL:40KOL, 40PUL:60KOL i 20PUL:80KOL. Kod ostalih analiziranih inkapsulata, primijećen je vrlo sličan trend prolongiranog i potpunog otpuštanja polifenola kroz prvih 60 minuta SGF faze, a nakon čega je uslijedila stagnacija. Daljnjim prelaskom u simuliranu intestinalnu fazu (SIF) pri pH=7, kod većine testiranih uzoraka detektiran je smanjeni udjel TPC-a.

Kod PUL:ZE dozirnih sustava nanovlakana, može se primijetiti drugačiji trend u odnosu na prethodno analizirane inkapsulate. Osim 15 PUL koji je slijedio ubrzanu kinetiku otpuštanja, kao i 12 PUL, preostali testirani inkapsulati rezultirali su poželjnim, prolongiranim otpuštanjem polifenola tijekom svih 120 minuta SGF faze, sa stagnacijom ili daljnjim nastavkom pozitivnog trenda (uzorak 50PUL:50ZE).

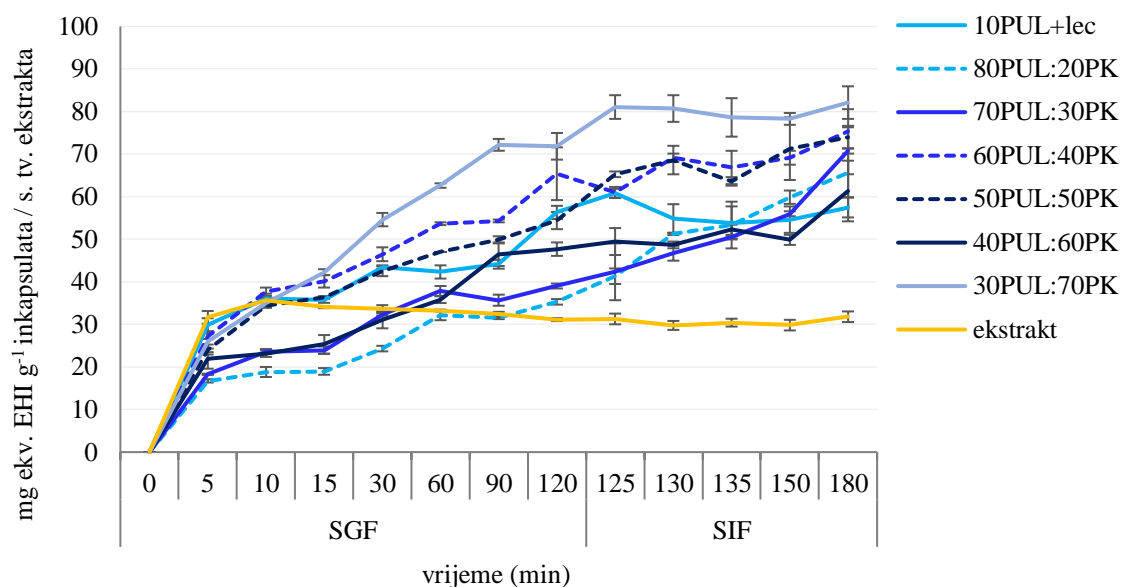
PUL:PK inkapsulati rezultirali su najpoželjnijom kinetikom otpuštanja ciljanih komponenata ekstrakta iz polimernog dozirnog sustava. Svim uzorcima, osim 10 PUL+lec, analizirano je prolongirano otpuštanje ukupnih polifenola i tijekom SIF faze, pri čemu su se posebno istaknula nanovlakna 80PUL:20PK te 70PUL:30PK.



a)



b)



c)

Slika 68. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola u *in vitro* probavnom sustavu za nanovlakna na bazi: a) pululana i hidroliziranog kolagena, b) pululana i zeina i c) pululana i proteina konoplje.

4.7. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda

4.7.1. Bioaktivna karakterizacija

Nakon uspješne valorizacije ekstrakta trave ive formulacijom inkapsuliranih dozirnih sustava u obliku mikročestica i nanovlakana, za finalni korak inkorporacije u prehrambeni proizvod odabran je praškasti inkapsulirani sustav na bazi karboksimetil celuloze (KMC_KAR) obzirom na najprikladnija fizikalno-kemijska svojstva te najveći udjel istraživanih feniletanoidnih glikozida analiziranih na ukupnu masu inkapsulata.

Proizvedeno je pet žele punjenih proizvoda uniformnog izgleda (Slika 69):



Slika 69. Vizualni prikaz funkcionalnih žele punjenih proizvoda na bazi škroba.

U svrhu određivanja udjela bioaktivnih komponenata koji se mogu unijeti po jednom komadu žele punjenog proizvoda, provedena je analiza udjela pojedinačnih feniletanoidnih glikozida te metilksantina podrijetlom iz kakaovih dijelova čokoladnog punjenja. Udio suhe tvari žele proizvoda kretao se između 90 i 92 %. Prema dobivenim rezultatima, po jednoj porciji (6 g) može se unijeti između 8 i 16 mg svih analiziranih bioaktivnih komponenata, uključujući ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid, te teobromin i kafein, pri čemu se otprilike 60 % analiziranog udjela odnosi na feniletanoidne glikozide (Tablica 52).

Tablica 52. HPLC analiza feniletanoidnih glikozida i metilksantina

| Formulacija | mg po porciji ¹ | | | | | | |
|------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | EHI | TEU* | STAH A* | POLI* | VERB | TEO | KAF |
| 100KŠ | 2,27±0,06 | 0,80±0,01 | 0,94±0,02 | 2,99±0,07 | 0,85±0,02 | 4,99±0,11 | 0,54±0,01 |
| 75KŠ_25KZ | 1,38±0,01 | 0,47±0,00 | 0,56±0,00 | 1,81±0,02 | 0,50±0,01 | 3,11±0,03 | 0,33±0,00 |
| 50KŠ_50KZ | 2,12±0,03 | 0,70±0,00 | 0,86±0,02 | 2,71±0,04 | 0,770,01 | 4,60±0,06 | 0,49±0,01 |
| 25KŠ_75KZ | 2,29±0,02 | 0,76±0,00 | 0,92±0,01 | 2,91±0,03 | 0,82±0,01 | 4,92±0,04 | 0,53±0,01 |
| 100KZ | 2,73±,0,00 | 0,92±0,01 | 1,12±0,01 | 3,48±0,00 | 1,01±0,00 | 5,83±0,01 | 0,62±0,00 |

EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; TEO-teobromin; KAF-kafein; ¹ kvantificirano u mg ekv. EHI na s. tv. jedne porcije bombonskog proizvoda (1 porcija=6 g); *=izraženo u mg ekv. EHI g⁻¹ s. tv.

4.7.2. Teksturalna svojstva

U cilju usporedbe s rezultatima senzorskog ocjenjivanja, provedena je i instrumentalna analiza mjerenja teksture (eng. *texture profile analysis*, TPA test) formuliranih bombonski proizvoda (Tablica 53). Nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između receptura obzirom na izmjerena svojstva kohezivnosti, elastičnosti, žilavosti i žvakljivosti. Ovisno o udjelu kukuruznog, odnosno kudzu škroba, jedino je uočena razlika u tvrdoći između formulacija ($p < 0,05$). Tvrdoća kod formulacije 100 KZ (978,94 g) određena je kao statistički značajno ($p < 0,05$) veća u odnosu na 100 KŠ (794,94 g). Obzirom na potencijalnu mogućnost korelacije tvrdoće proizvoda i pojedinih škrobnih sastavnica, izmjereni su udjeli amiloze i amilopektina u korištenim škrobovima. Kudzu škrob karakterizira udjel amiloze i amilopektina od 18,50 % i 81,50 %, dok su amiloza i amilopektin u komercijalnom kukuruznom škrobu bili zastupljeni s 21,48 %, odnosno 78,52 % udjela.

Tablica 53. Teksturalna svojstva punjenih žele proizvoda

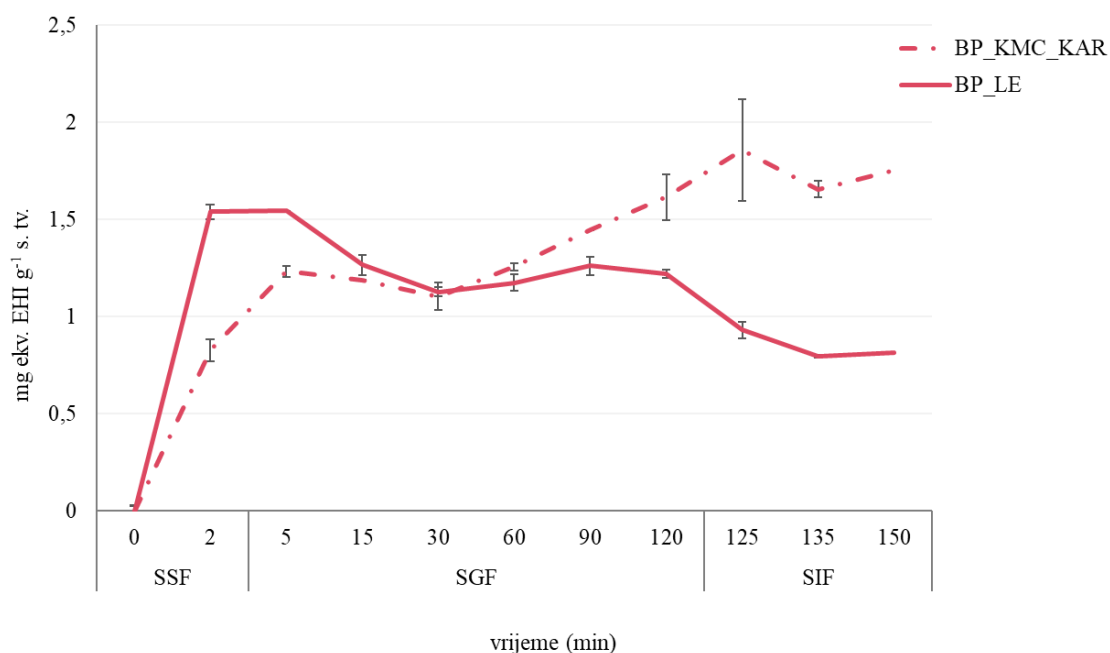
| Formulacija | Tvrdoća (g) | Kohezivnost (g) | Elastičnost (g) | Žilavost (g) | Žvakljivost (g) |
|------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 100KŠ | 794,94±7,42 ^a | 1,22±0,67 | 1970,45±370,45 | 975,77±54 | 35506,30±1428 |
| 75KŠ_25KZ | 850,78±9,79 | 1,67±0,14 | 2305,68±26,14 | 1423,44±137 | 32855,89±538 |
| 50KŠ_50KZ | 765,81±14,40 ^b | 1,91±0,11 | 2327,27±4,55 | 1464,67±54 | 34089,32±1312 |
| 25KŠ_75KZ | 829,46±62,90 | 1,38±0,45 | 2248,86±87,50 | 1120,41±286 | 25446,69±1408 |
| 100KZ | 978,94±28,42 ^{ab} | 1,63±0,03 | 2359,09±2,27 | 1598,1±520 | 37701,42±425 |

Statistička obrada provedena je koristeći jednosmjernu analizu varijance (eng. *one way ANOVA*) uz Tukey post hoc test. Vrijednosti označene istim slovom su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

4.7.3. Kinetika otpuštanja polifenola u *in vitro* uvjetima

U cilju usporedbe biorasploživosti polifenolnih spojeva iz neinkapsuliranog, liofiliziranog ekstrakta (kontrolni uzorak) u odnosu na ekstrakt inkapsuliran u KMC_KAR sustavu nosača, provedeno je praćenje kinetike otpuštanja polifenolnih spojeva određivanjem ukupnih hidrokscimetnih kiselina (HC). Na Slici 70 jasno se vidi značajno prolongirano otpuštanje polifenolnih spojeva ekstrakta trave ive iz inkapsuliranog sustava unutar prehrambenog matriksa tijekom promatranih 150 minuta oralne i gastrontestinalne faze, u odnosu na gotovo trenutnu biorasploživost promatranih spojeva iz liofiliziranog ekstrakta.

Vidljiva je degradacija polifenolnih spojeva iz kontrolnog uzorka od početnih $1,54 \text{ mg g}^{-1} \text{ s. tv.}$ do finalnih $0,81 \text{ mg g}^{-1} \text{ s. tv.}$), uslijed direktne izloženosti kiselo-lužnatim uvjetima simulirajućih probavnih fluida, budući da je udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina smanjen za oko 50 %. S druge strane, efekt „zaštite“ uslijed prisutnosti polimernih nosača vidljiv je kod uzorka s inkapsuliranim ekstraktom, s maksimumom otpuštanja promatranih ukupnih derivata hidroksicimetnih kiselina u intestinalnoj fazi nakon 125 minuta.



BP_KMC_KAR=žele bombonski proizvod s inkapsuliranim ekstraktom; BP_LE=žele bombonski proizvod s liofiliziranim ekstraktom

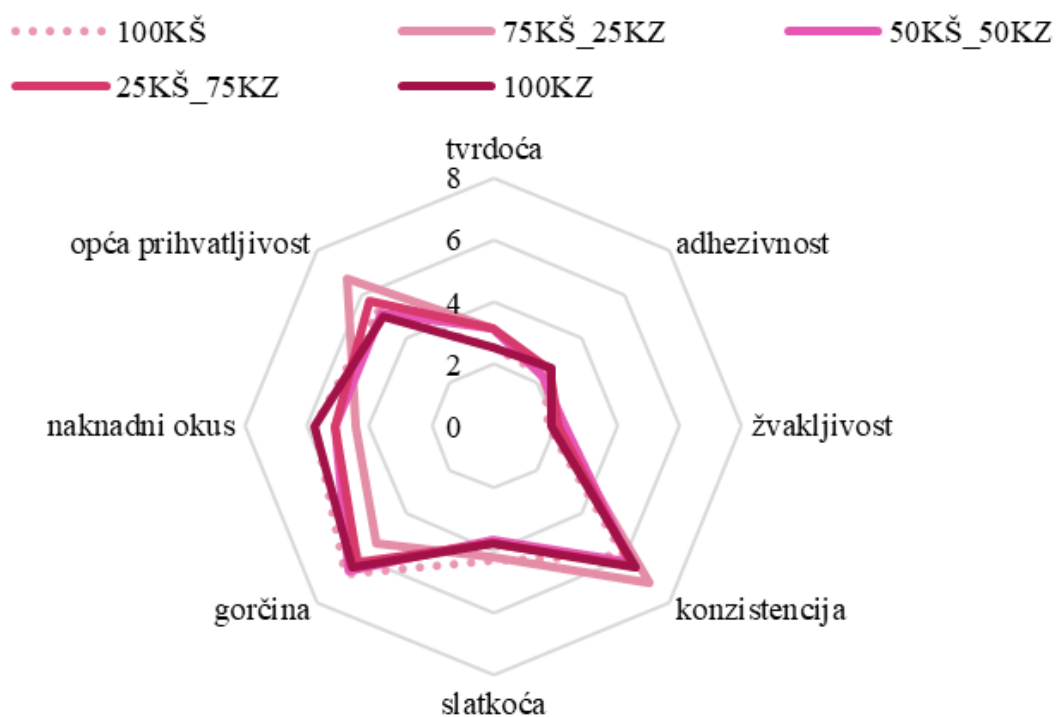
Slika 70. *In vitro* kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva ekstrakta trave ive iz punjenog žele proizvoda.

4.7.4. Senzorska svojstva

Primjenom hedonističke skale intenziteta (1=najmanje izražen intenzitet, 9=najviše izražen intenzitet, u odnosu na kontrolu), ocijenjena su prethodno selektirana senzorska svojstva: tvrdoća, adhezivnost, žvakljivost, konzistencija, slatkoća, gorčina, naknadni okus te prihvatljivost (Slika 71).

Sve formulacije su prilikom konzumacije ocijenjene kao slabo adhezivne prilikom konzumacije (prosječna ocjena: 2,2-2,7), te nije bilo statistički značajnih ($p>0,05$) razlika u minimalno prisutnoj tvrdoći i žvakljivosti. Formulacija 75KŠ_25KZ imala je najviše

izraženu kremoznost i najmekaniju teksturu (prosječna ocjena: 7,2), u odnosu na ostale formulacije (prosječna ocjena: 5,9-6,4), a što opisuje svojstvo konzistencije. Obzirom na ocjene opće prihvatljivosti, među svim formulacijama istaknula se 75KŠ_25KZ s najpoželjnijim teksturalnim karakteristikama (prosječna ocjena: 6,7).



Slika 71. Rezultati senzorske analize obogaćenih funkcionalnih žele proizvoda na bazi škroba.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je karakterizacija kemijskog, bioaktivnog sastava i bioloških učinaka ekstrakta tradicionalne biljne vrste trave ive (*Teucrium montanum* L.) u svrhu njezine valorizacije kroz proširenje mogućnosti iskorištenja njezinog funkcionalnog potencijala. Iako se od davnina koristi u ljekovite svrhe, polifenolni profil i biološka aktivnost trave ive izrazito su limitirani.

Sakupljenim biljnim materijalima trave ive najprije je određen nutritivni profil. U cilju detaljne karakterizacije polifenolnog sastava svih uzoraka trave ive, kao i postizanja maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti, pristupljeno je optimizaciji tehnika konvencionalne ekstrakcije zagrijavanjem, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ekstrakcije subkritičnom vodom primjenom metode odzivnih površina. Sljedeći korak uključivao je identifikaciju nepoznatih spojeva kombinacijom NMR spektroskopije i UHPLC-HR MS/MS analize u ekstraktima prema optimiranim ekstrakcijskim uvjetima, uz daljnje određivanje kvantitativnog udjela pojedinačnih polifenola HPLC-DAD metodom. Odabran je ekstrakt s najvećim udjelom polifenolnih komponenti, te mu je daljnjom primjenom *in vitro* te *in vivo* odgovarajućih metoda ispitana biološka aktivnost. *In vitro* eksperimentalni dio uključivao je određivanje citotoksičnog i prooksidacijskog djelovanja ekstrakta na humanim staničnim linijama probavnog sustava, kao i citotoksični učinak na odabrane predstavnike humane mikrobiote, te određivanje genotoksičnog učinka ekstrakta na modelnu DNK i humane stanične linije probavnog sustava. Na *in vivo* modelu štakora ispitan je učinak ekstrakta na promjenu mase štakora i njihovih organa, biokemijske i hematološke parametre krvi, markera oksidacijskog stresa jetre i bubrega, kao i određivanje genotoksičnog učinka standardnim komet testom na krvi, jetri i bubrezima. U završnoj fazi istraživanja, ekstrakt trave ive inkapsuliran je tehnikama elektroispredanja i sušenjem raspršivanjem primjenom binarnih sustava nosača. Na svim polimernim otopinama u ekstraktu trave ive provedena je fizikalna i/ili reološka karakterizacija. Formuliranim nanovlaknima dobivenima elektroispredanjem te inkapsulatima dobivenima sušenjem raspršivanjem određene su fizikalne i fizikalno-kemijske karakteristike, toplinska svojstva, inkapsulacijska učinkovitost i kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva u simuliranim *in vitro* uvjetima probave. Konačno, inkapsulat najprikladnijih fizikalno-kemijskih svojstava odabran je za inkorporaciju u formulacije veganskih žele punjenih bombonskih proizvoda na bazi škroba. Na inovativnim funkcionalnim proizvodima provedena je bioaktivna karakterizacija, kao i teksturalna te senzorska analiza.

5.1. Kemijski sastav trave ive

Primjenom odgovarajućih AOAC standardnih metoda za određivanje makrokomponentnog sastava te atomske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES), prikupljeni su podaci vezani za kemijski sastav trave ive, a koji mogu poslužiti za evaluaciju biljnog materijala trave ive kao potencijalnog izvora topljivih i netopljivih vlakana, proteina, lipida i mineralnih tvari, ovisno o lokalitetu. Obzirom da su biljne vrste iz roda *Teucrium* u tradicionalnom smislu uglavnom korištene za konvencionalne postupke ekstrakcije bioaktivnih komponenti u svrhu terapijskog djelovanja, istraživanja vezana za kemijski sastav izrazito su limitirana.

Premda se mogu uočiti statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u udjelu lipida, proteina, mineralnih tvari te ukupnih vlakana ovisno o mikrolokaciji, u vidu mogućeg komercijalnog iskorištenja svi ispitani uzorci trave ive mogu se promatrati kao jednakovrijednim izvorima za ekstrakciju spomenutih komponenti. Izrazito visok udjel netopljivih vlakana (iznad 50 %) u nadzemnom dijelu biljke je očekivan, obzirom da sastav stanične stijenke biljnog materijala većinski i čine strukturni polisaharidi, odnosno celuloza (40-50 %), hemiceluloza (15-25 %) i lignin (5-10 %) (Zeng i sur., 2017). U svim uzorcima određen je nizak udjel proteina (< 8 %) u usporedbi s konvencionalnim biljnim izvorima poput mahunarki (20-40 %) (Carbonaro, 2021), kao i nizak udjel lipidne frakcije. Značajne razlike u kemijskom sastavu uvjetovane su geografskim položajem, klimatskim i okolišnim uvjetima rasta, kemijskom sastavu tla, genetičkim osobitostima, fenološkom fazom rasta, ispitivanim dijelom biljke i dr. (Maqsood i sur., 2020). Tako su Alghazeer i sur. (2021) u biljnom materijalu stabiljke i lista *Teucrium polium* podrijetlom iz Libije odredili zanemarive udjele proteina (1,83 %), lipidne frakcije (0,17 %) te vrlo nizak udjel ukupnih ugljikohidrata (13,32 %). S druge strane, Hussain i sur. (2013) u *T. polium*, sakupljenoj u Omanu, odredili su udjele proteina (9,10 %) i lipida (4,90 %) usporedive s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju, sa znatno nižim udjelima netopivih polisaharida (20,20 %), a što može biti posljedica korištenja druge, manje selektivne analitičke metode. Usporedno s drugim kultiviranim biljnim vrstama iz porodice Lamiaceae, pokazalo se da analizirana trava iva ima i do tri puta manji udjel ukupne lipidne frakcije u odnosu na, primjerice, ružmarin (8,18 %), matičnjak (5,85 %) timijan (6,95 %) ili kadulju (8,96 %), dok je udjel ukupnih ugljikohidrata, mineralnog ostataka i proteinske frakcije vrlo sličan rezultatima istraživanja (Tomescu i sur., 2015). Uspoređujući rezultate karakterizacije sastava masnih kiselina iz ekstrahirane lipidne frakcije standardnom metodom AOAC 963.22, može se uočiti prisutnost zasićenih i esencijalnih masnih kiselina inače kvantificiranih u većini biljnih vrsta iz

Lamiaceae porodice, poput palmitinske (C16:0), oleinske (C18:1 ω 9), linoleinske (C18:2 ω 6), i α -linolenske (C18:3 ω 3) (Fafal i sur., 2022). Vrlo sličan profil masnih kiselina u lipidnim frakcijama bosiljka, timijana, ružmarina i mažurana identificiran je i u radu Daga i sur. (2022), samo u drugačijim udjelima. Udjel ekstrahiranih lipida bio je u rangu od 2,27-4,57 %, a kao i u travi ivi, većinski udjel sastava masnih kiselina odnosio se na palmitinsku (36,45 % u bosiljku, 31,81 % u timijanu, 35,53 % u ružmarinu, 19,35 % u mažuranu), linoleinsku (15,55 % u bosiljku, 14,77 % u timijanu, 12,04 % u ružmarinu, 21,50 % u mažuranu) i α -linolensku (34,13 % u bosiljku, 35,32 % u timijanu, 35,72 % u ružmarinu, 39,01 % u mažuranu). Dominantan udjel palmitinske (15,17-27,71 %), među zasićenim masnim kiselinama, te linoleinske (10,88-19,47 %) i α -linolenske (40,68-56,53 %), među višestruko nezasićenim masnim kiselinama, u ispitanim vrstama iz roda *Satureja*, *Thymus* i *Origanum* također je detektiran u radu Čačan i sur. (2018), samo u znatno višim udjelima u odnosu na travu ivu. Poznato je da ω 3 i ω 6 masne kiseline posjeduju snažan neuroprotektivni učinak, kao i da utječu na poboljšanje neuroloških funkcija, antidepresiva i sl. (Barón-Mendoza i González-Arenas, 2022; Yu i sur., 2021). U slučaju arahidonske masne kiseline, u svim uzorcima trave ive je detektiran značajno veći udjel (5,22-23,86 %) u odnosu na mažuran (1,04 %), dok u bosiljku, origanu i ružmarinu ova zasićena masna kiselina nije detektirana. Beheninska kiselina (C22:00) također je identificirana u *Lamiaceae* ispitivanim vrstama prema radu Daga i sur. (2022), no u značajno manjim udjelima (0,78-1,74 %) nego u travi ivi, ukoliko uspoređujemo s uzorcima TI_2 (12,04 %), TI_3 (6,68 %) i TI_6 (21,06 %), dok je u radu Čačan i sur. (2018) ista masna kiselina detektirana samo u *Thymus* vrstama (12,39-18,55 %).

Detaljna analiza makro- i mikroelementarnog sastava ukazuje na isti trend zastupljenosti makroelemenata (mg kg⁻¹) neovisno o lokalitetu ispitanih uzoraka trave ive i s manjim odstupanjima u kvantitativnim udjelima, slijedom: Ca > K > Mg > Fe > P > Na. Obzirom na redoslijed kvantitativnog udjela makroelemenata, rezultati iz studije Zlatić i Stanković (2019) najbliže koreliraju s rezultatima u ovom radu. S druge strane, Pavlova i Karadjova (2012) ispitivali su akumulaciju Ca, Mg, Ca:Mg i Fe u nadzemnom dijelu biljnih uzoraka trave ive sa šest lokaliteta u Bugarskoj te su zabilježili relativno niže vrijednosti Ca (2980-8209 mg kg⁻¹), više vrijednosti Mg (1932 -626 mg kg⁻¹), u većini slučajeva niži omjer Ca i Mg (0,03-7,08) te relativno sličan raspon Fe (148-1490 mg kg⁻¹), u odnosu na rezultate ovog istraživanja za Ca (p>0,05; 12108-9795 mg kg⁻¹), Mg (p>0,05; 1210-1934 mg kg⁻¹), Ca:Mg (5,06-0,01) te Fe (162-1538 mg kg⁻¹). S druge strane, ekstremno nizak udjel Ca (58 mg kg⁻¹) u nadzemnoj frakciji trave ive prikupljene s Velebita (Veliko Rujno) zabilježen je u radu Cindrić i sur. (2013), uz slične udjele K (6470 mg kg⁻¹), Mg (1430 mg kg⁻¹) i Na (18 mg kg⁻¹),

u odnosu na uzorke trave ive prikupljene u Primorskoj Hrvatskoj. Dodatno, provedena je i analiza ekstraktibilnosti makroelemenata tijekom pripreme biljne infuzije (0,5 g : 20 mL, 90 °C, 10 minuta) pri čemu je ekstrakcijska učinkovitost za K, Mg, Ca i Na iznosila 33, 12,5, 17,3 i 24,5 %. Zlatić i sur. (2017) su u uzorcima s različitih planinskih lokaliteta u Srbiji (360 m do 1450 m nadmorske visine) detektirali najveći udjel K, a slijede ga Ca, Mg i Fe. Analizom pripremljenih biljnih infuzija (1 g : 100 mL, 100 °C, 10 minuta) utvrdili su značajno veću ekstrakcijsku učinkovitost usporedno sa rezultatima iz rada Cindrić i sur. (2013) za K (42-49 % = 3899 mg kg⁻¹), Ca (48-84 % = 884 mg kg⁻¹) i Mg (60-86 % = 1078 mg kg⁻¹), a što implicira na obećavajući potencijal biljne infuzije trave ive u osiguranju dodatnog unosa ispitivanih makroelemenata, a s ciljem održavanja ravnoteže elektrolita, pravilne aktivnosti živčanog, kardiovaskularnog i mokraćnog sustava, zdravlja koštanog tkiva i dr. (WHO, 2004).

Od esencijalnih i korisnih mikroelemenata, u svim analiziranim uzorcima trave ive zabilježene su značajne količine vanadija (V: 441-2596 µg kg⁻¹), kroma (Cr: 428-2969 µg kg⁻¹), bakra (Cu: 5781-7593 µg kg⁻¹) i molibdena (Mo: 241-726 µg kg⁻¹). Zajedno s određenim udjelima cinka (Zn: 27-42 µg kg⁻¹), selena (Se: 11-38 µg kg⁻¹), mangana (Mn: 21-63 µg kg⁻¹) i kobalta (Co: 75-576 µg kg⁻¹), dobiveni maseni udjeli ispitivanih mikroelemenata slični su ili čak veći od udjela detektiranih u radovima Zlatić i sur. (2017), Zlatić i Stanković (2019), Cindrić i sur. (2013) te Pavlova i Karadjova (2012). Zn, Mn, Cu i Cr detektirani su u biljnim infuzijama u količinama od 21,0, 5,05, 2,16 i 1,23 µg L⁻¹. Analiza uzoraka trave ive na udjel žive (Hg: 7,8-14,6 µg kg⁻¹), arsena (As: 47-331 µg kg⁻¹), nikla (Ni: 312-1931 µg kg⁻¹), olova (Pb: 223-2160 µg kg⁻¹), kadmija (Cd: 4,8-59 µg kg⁻¹) i aluminijsa (Al: 97-630 µg kg⁻¹), rezultirala je znatno nižim vrijednostima u odnosu na dostupne studije, te je time potvrđen prethodno dokazani zanemariv afinitet ove biljne vrste za bioakumulacijom toksičnih metala (Zlatić i sur., 2017; Zlatić i Stanković, 2019; Dražen i sur., 2013). Prema dostupnoj literaturi, zabilježena je ili relativno niska ekstraktibilnost proučavanih metala u biljnim infuzijama trave ive (Ni: 6,70 µg L⁻¹, Pb: 3,52 µg L⁻¹, Al: 1,53 µg L⁻¹) ili je rezultat bio ispod limita detekcije obzirom na udjel u početnom biljnom materijalu, a što je indikator za sigurnu konzumaciju vodenih biljnih infuzija (Cindrić i sur., 2013; Zlatić i sur., 2019).

5.2. Polifenolni sastav ekstrakata trave ive

Prvi korak u karakterizaciji i valorizaciji biljnih ekstrakata kao tradicionalnih izvora polifenolnih spojeva predstavlja ekstrakcija kao ravnotežni postupak separacije jedne ili više komponenti iz ishodišnog matriksa pomoću selektivnog otapala. U postizanju ekonomski i

energetski optimalne ekstrakcijska učinkovitosti ciljanih spojeva, glavna pozornost usmjerena je prema: i) izboru ekstrakcijske tehnike, ii) optimizaciji ekstrakcijskih uvjeta te iii) fizikalno-kemijskim karakteristikama ishodišnog matriksa, kao i spojeva od interesa. Tijekom posljednjeg desetljeća, intenzivno se istražuju ne-termalne ili inovativne ekstrakcijske tehnike kao zamjene za konvencionalne ili toplinski potpomognute tehnike, a sve u svrhu integracije održivosti i energetske učinkovitosti u različite biotehnoške, prehrambene i farmaceutske proizvodne procese. Tako su uspješno dizajnirani visokoučinkoviti pilot-proizvodni sustavi za primjerice, valorizaciju stabljika grožđa kao agronusprodukta proizvodnje vina kroz ekstrakciju polifenolnih spojeva ultrazvučno-potpomognutom ekstrakcijom (Grillo i sur., 2020), ili ekstrakciju ulja iz rižinih mekinja, lanenih sjemenki i šafranike primjenom ekstrakcije superkritičnim CO₂ (Neeharika i sur., 2024), a što implicira na obećavajuću komercijalizaciju proizvodnje.

5.2.1. Optimizacija ekstrakcije ekstrakcije polifenola konvencionalnom tehnikom

Konvencionalne tehnike ekstrakcije (HAE) uključuju sve metode separacije ciljanih komponenti pri sobnoj temperaturi pomoću relativno selektivnog otapala ili uz primjenu topline direktnim zagrijavanjem otapala ili ekstrakcijske smjese. Premda je fokus znanstvene zajednice posljednjeg desetljeća preusmjeren na istraživanja inovativnih tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva u cilju komercijalizacije i postupne djelomične ili potpune zamjene konvencionalnih tehnika, zahtjevnost prijelaza ovih tehnika na veće mjerilo te visoki investicijski troškovi i dalje osiguravaju konvencionalnim tehnikama čvrstu poziciju na tržištu, obzirom na jednostavnost primjene, zadovoljavajuće prinose i relativnu ekonomičnost. Najčešće korištene konvencionalne tehnike uključuju maceraciju (sa ili bez miješanja), infuziju, dekokciju, perkolaciju, Soxhlet ekstrakciju, hidrodestilaciju i dr.

Sukladno navedenome, u ovom radu provedena je optimizacija konvencionalne tehnike ekstrakcije (HAE) polifenola iz trave ive, pri čemu su temperatura (80, 90 i 100 °C), vrijeme tretmana (10, 20 i 30 minuta) te omjer uzorka i otapala (1 g : 25 mL, 1 g : 40 mL, 1 g : 100 mL) definirani kao nezavisne/procesne varijable. Statistički značajan utjecaj temperature te omjera uzorka i otapala ($p < 0,05$) na povećanje TPC-a određen je kvadratnim regresijskim modelom, dok su isti utjecaji na odziv ABTS i DPPH definirani linearnim odzivnim modelima. Numeričkom optimizacijom, uvjeti pri 100 °C, 30 minuta te omjeru uzorka i otapala od 1 g : 100 mL rezultirali su ekstraktom trave ive najizraženijeg bioaktivnog potencijala.

Muala i sur. (2021) također su pristupili tehnici dekokcije u vodenoj kupelji za ekstrakciju polifenola iz limunske trave korištenjem centralno-kompozitnog dizajna uz variranje temperature (85-95 °C), omjera uzorka i otapala (2-5 g : 100 mL⁻¹) te vremena tretmana (5-10 minuta). Sukladno rezultatima ovog rada, također je utvrđen linearni, ali i kvadratni utjecaj ($p < 0,05$) povećanja temperature, volumena otapala, ali i vremena tretmana na odzivne varijable koje su prema optimalnim uvjetima (93,8 °C, 11,3 minuta i 5g : 100 mL) iznosile kako slijedi: TPC: 71,98 mg GAE 100 mL⁻¹, DPPH: 80,63 mg GAE 100 mL⁻¹. Poznato je da povećanje volumena otapala u odnosu na masu materijala rezultira povećanim prijenosom mase, i, produljenjem vremena do uspostavljanja ravnotežnog gradijenta između matriksa i otapala, a što omogućuje maksimalno iscrpljenje materijala. Nadalje, povišenje temperature povećava topljivost polifenola u odgovarajućem otapalu, obzirom na omekšavanje staničnog matriksa i stijenke, značajno utječući na dinamiku ekstrakcije do određene granice. Naime, velika prednost optimizacije upravo leži u definiranju granične temperature iznad koje dolazi do neželjenog efekta, odnosno do degradacije komponenti (Irakli i sur., 2018). Sličan eksperimentalni pristup uspješno je primijenjen na sjemenkama, pulpi i plodu kaktusa (30, 60 i 90 °C, 1, 3, i 5 g 100 mL⁻¹, 10, 20 i 30 minuta), pri čemu je također utvrđen statistički značajan utjecaj temperature te omjera uzorka i otapala za sva tri slučaja. Ekstrakt najizraženijeg antioksidacijskog kapaciteta (ABTS_{pulpe}: 4,03 mmol TE 100 g⁻¹) dobiven je pri uvjetima od 90 °C, 1 g : 100 mL i 30 minuta (Zeghib i sur., 2022). Osim dekokcije, tehnika maceracije pri sobnoj temperaturi ili potpomognuta toplinom također je vrlo istraživana konvencionalna tehnika koja daje zadovoljavajuće rezultate. Tako su Jovanović i sur. (2017) uspoređivali učinkovitost maceracije majčine dušice pri sobnoj temperaturi s konvencionalnom ekstrakcijom uz toplinu (HAE) i ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom (UAE) variranjem omjera uzorka i otapala (1 g : 10, 20 i 30 mL), udjela etanola, stupnja usitnjenja čestica (0,3, 0,7 and 1,5 mm) i vremena ekstrakcije (5-90 min). Dobiveni rezultati TPC-a za macerate bili su neznatno manji u odnosu na rezultate TPC-a za HAE i UAE ekstrakte, a u kontekstu maceracije, sve pojedinačne nezavisne varijable (omjer uzorka i otapala, udjel etanola i veličina čestica) su statistički značajno utjecale na udjel TPC-a. Stoga su korištenjem faktorijalnog dizajna, optimirani uvjeti maceracije: 0,3 mm, 1 g : 30 mL i 50 %-tni etanol (v/v) (Jovanović i sur. (2017). Cvetanović i sur. (2020) pristupili su ekstrakciji tanina iz sjemenki tamarinda maceracijom uz povišenu temperaturu (20-60 °C, 1 g : 20-40 mL, 30-70 %-tni metanol, v/v), a korištenjem metode odzivne površine također su uspostavili optimalne parametre pri odabranim uvjetima testiranja (23,38 °C, 1 g : 20 mL, 69,99 % metanol, v/v).

5.2.2. Optimizacija ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je jedna od najistraživanijih netermalnih tehnika, a temelji na pretvorbi elektromagnetske u toplinsku energiju kao posljedice interakcije polarnog otapala s mikrovalnim zračenjem. Stvorena toplina kao rezultat kinetičke energije uslijed brzog orijentiranja molekula otapala u promjenjivom smjeru elektromagnetskog polja značajno olakšava difuziju otapala u matriks, dezintegraciju intermolekularnih veza te posljedično izdvajanje komponenti od interesa u primijenjeno otapalo do postizanja ravnoteže (Yahya i sur., 2018). MAE uključuje sinergističku kombinaciju prijenosa mase i topline koji djeluju u istom smjeru. Prilikom trenutnog zagrijavanja matriksa, voda isparava, stvara tlak pare dovoljan za disrupciju stanične stijenke, tako potičući prijelaz komponenti od interesa u otapalo. Iako ova tehnika nudi održivi ekstrakcijski pristup bez korištenja toksičnih organskih otapala uz značajnu uštedu energije i vremena tretmana, limitirajući faktor komercijalizacije ove tehnike je neravnomjernost distribucije i nemogućnost kontrole topline generirane mikrovalnim zračenjem u uzorku (Gahruie i sur., 2020; Zhao i sur., 2021).

U ovom radu, provedena je MAE optimizacija ekstrakcije polifenola iz trave ive pri snazi od 900 W uz variranje temperature (50, 70 i 90 °C), vremena tretmana (3, 6 i 9 minuta) te omjera uzorka i otapala (1 g : 25 mL, 1 g : 40 mL, 1 g : 100 mL). Statistički značajan utjecaj na povećanje TPC-a te antioksidacijskog kapaciteta određen je linearnim modelima za temperaturu te omjer uzorka i otapala ($p < 0,05$), a provedba ekstrakcije pri 90 °C, kroz 15 minuta te omjerom uzorka i otapala od 1 g : 100 mL rezultirala je ekstraktom trave ive najizraženijeg bioaktivnog potencijala. Sličan trend ovisnosti odzivnih varijabli o temperaturi procesa (50-130 °C), omjeru uzorka i otapala (10-50 mL g⁻¹) te vremenu tretmana (5-45 minuta), kao i u ovom radu, utvrdili su Figueroa i sur. (2021) pri ekstrakciji polifenola iz kore avokada kao agronusprodukta. Dodatno, u radu je optimiran i udjel etanola u otapalu (0-100 %). Analizom varijance utvrđen je kvadratni model kao najprikladniji za optimizaciju, sa značajnim utjecajem povećanja temperature, volumena otapala naspram mase uzorka i udjela etanola na povećanje TPC-a ($p < 0,05$), dok linearan utjecaj vremena nije bilo statistički značajan za povećanje ekstrakcijskog prinosa ($p > 0,05$). Ustanovljeni optimalni uvjeti (130 °C, 39 minuta, 1 g : 44 mL, 36 %-tnog etanola, v/v) rezultirali su predviđenim TPC-om od 72,04 mg GAE g⁻¹ u odnosu na, primjerice značajno niži prinos TPC-a od 30,8 mg GAE g⁻¹ dobivenog primjenom niže temperature i manjeg volumena otapala (TPC pri 70 °C, 35 minuta, 1 g : 20 mL, 25 %-tnog etanola). Poznato je da, u kontekstu MAE, povećanje volumena otapala u odnosu na ispitivani

materijal rezultira generiranjem većeg tlaka pare, i posljedično, učinkovitijom disrupcijom stanične stijenke materijala (Karami i sur., 2015). Gahruie i sur. (2020) utvrdili su statistički značajnu ovisnost udjela TPC, ukupnih flavonoida i antocijana iz latica šafrana o duljini ekstrakcijskog tretmana (1-5 minuta pri čemu je optimalno vrijeme iznosilo 4,25 minuta uz maksimalnu snagu mikrovalne energije od 500 W) koristeći kvadratni matematički model. Nadalje, Casazza i sur. (2020) su u svom radu primijenili znatno duže vrijeme tretmana (30, 60 i 90 min) i više temperature od uobičajenih (90, 120 i 150 °C) u inertnoj atmosferi za prevenciju degradacijskih reakcija, uz optimizaciju otapala (20, 60 i 100 %-tni etanol, v/v). Kvadratnim modelom utvrđen je statistički značajan učinak temperature i udjela etanola u otapalu na TPC prinos, dok su za prinos ukupnih flavonoida sve tri varijable bile značajne ($p < 0,05$). Numeričkom optimizacijom procijenjeni su optimalni uvjeti kako slijedi: 150 °C, 32%-tnog (v/v) etanola i 90 minuta koji su rezultirali visokom ekstrakcijskom učinkovitošću (TPC: 59 mg GAE g⁻¹ s. tv., 14 mg TE g⁻¹ s. tv.).

U cilju proširenja komercijalne primjene ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, jedan od mogućih, premda nedovoljno istraženih pristupa, može biti eksperimentalno utvrđivanje specifičnih procesnih faktora koji poboljšavaju transfer mase tijekom mikrovalnog zagrijavanja, kao i svojstava toplinske vodljivosti biomase ili materijala kao indikatora prikladnosti za mikrovalni tretman. Tako su Mao i sur. (2021) u svom radu predstavili svoj eksperimentalni pristup u procjeni prikladnosti biomase za MAE, odnosno HAE tretman u ekstrakciji pektina. Mjerenjem termalne konduktivnosti (k) i faktora dielektričnog gubitka (ϵ'') ispitivanog matriksa, utvrdili su značajan utjecaj većih vrijednosti ϵ'' biomase od ϵ'' vode na povećanje transfera topline i mase tijekom MAE, odnosno smanjenje transfera topline i mase tijekom konvencionalnog zagrijavanja, a što je ujedno i posljedica smanjene termalne konduktivnosti u sustavu uslijed dodataka biomase. Ustanovljen je i značajan utjecaj identificiranja granične vrijednosti mikrovalne energije iznad koje fenomen temperaturno inducirane difuzije potiče prijenos mase, a što je bitno za uspješnu optimizaciju ekstrakcije, uštedu energije i sl.

5.2.3. Optimizacija ekstrakcije subkritičnom vodom

Slijedeći koncept održivosti i primjenu vode kao ekološkog otapala, ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) može biti pogodna za proizvodnju ekstrakata bogatih relativno nepolarnim polifenolnim spojevima obzirom na modifikaciju fizikalno-kemijskih svojstava vode u radnim uvjetima blizu njezinog superkritičnog stanja. Pri temperaturnim uvjetima

između 100-374 °C i dovoljno visokom tlaku (10-100 bara) za održavanje vode u tekućem stanju, dielektrična konstanta vode kao mjera polarnosti otapala, modificira se prema vrijednostima sličnim organskim otapalima (Ju i sur., 2005). Tako primjerice, povećanjem sa sobne temperature na 250 °C pri 25 bara dolazi do drastičnog smanjenja permitivnosti (ϵ) vode sa 79 na 27 uslijed kidanja intermolekularnih vodikovih veza, a što je slično vrijednosti etanola pri 25 °C. Dodatno, subkritični uvjeti smanjuju viskoznost i površinsku napetost te ubrzavaju proces difuzijskog transfera mase. Uz prednosti procesa, poput uštede vremena potrebnog za postizanje maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti i ekološkog pristupa, glavni nedostatak je sklonost degradaciji termolabilnih komponenti pri tretmanima izrazito visokih temperatura. S druge strane, SWE pokazuje značajan potencijal u biorafineriji za valorizaciju lignocelulozne biomase uz odgovarajući predtretman ishodišnog materijala. Tako su Pedras i sur. (2020) na komini crvenog grožđa uspješno primijenili SWE uz prethodan tretman celulazama u svrhu depolimerizacije hemiceluloze i osiguranja ekstrakata bogatih njenim derivatima, a što je rezultiralo i dobivanjem frakcija izraženog antioksidacijskog kapaciteta u primijenjenom temperaturnom rasponu (50-190 °C).

U ovom radu, provedena je SWE optimizacija polifenola iz trave ive pri konstantnom tlaku, pritom mijenjajući temperaturu (120, 160 i 200 °C), vrijeme (5, 10 i 15 minuta) te omjer uzorka i otapala (1 g : 100 mL, 1 g : 40 mL, 1 g : 25 mL). Ovisnost procesnih varijabli o TPC odzivu, odnosno antioksidacijskom kapacitetu opisana je linearnim, odnosno kvadratnim modelima. Statistički značajan utjecaj na povećanje ekstrakcijske učinkovitosti određen je za temperaturu te omjer uzorka i otapala za TPC i ABTS varijable, dok je vrijeme značajno utjecalo za odziv DPPH vrijednosti ($p < 0,05$). Prema numeričkoj optimizaciji, primjena tretmana pri maksimalnim procesnim uvjetima (200 °C, 15 minuta i 1 g : 100 mL) rezultirala je ekstraktima najizraženijeg bioaktivnog potencijala mjerenog TPC-om, te ABTS i DPPH antioksidacijskim kapacitetom. Poznato je da jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva subkritične vode uslijed povišenja temperature i tlaka značajno promoviraju disrupciju interakcija između ciljanih analita i matriksa, kinetiku prijenosa mase i difuzijski proces, tako utječući na selektivnost i ekstraktibilnost polifenola obzirom na njihovu polarnost (Plaza i Turner, 2015). Slične rezultate zabilježili su Pinto i sur. (2021) pri optimizaciji ekstrakcije polifenola iz ljuske kestena odabirom kvadratnog modela kao najprikladnijeg za prikaz međusobne ovisnosti odzivnih varijabli o procesnim uvjetima, te uz varijaciju vremena ekstrakcije (6-30 minuta) i temperature (51-249 °C) pri konstantnih 40 bara. Međutim, ekstrakti najizraženijeg antioksidacijskog kapaciteta i TPC-a dobiveni pri optimalnim uvjetima (30 minuta, 220 °C) rezultirali su drugačijim polifenolnim sastavom nego ekstrakt pripremljen pri

značajno manje intenzivnim radnim uvjetima (30 minuta, 80 °C). Naime, detektirani su elaginska kiselina, pirogalol i protokatehinska kiselina kao produkti termalne degradacije elagitanina, dekarboksilacije galne kiseline i termalne degradacije katehina. Ovakvi rezultati impliciraju na različite procese kojima se ispitivani matrici potencijalno podvrgava u subkritičnom stanju vode, a što uključuje pirolitičke, hidrolitičke, Maillardove, oksidacijske reakcije i sl., pri čemu se mogu generirati spojevi jednakog ili većeg antioksidacijskog kapaciteta, a što opravdava dobivene rezultate u navedenom istraživanju (Cvetanović i sur., 2018). U svrhu poboljšanja učinkovitosti SWE u ekstrakciji polifenolnih spojeva iz trave ive, Nastić i sur. (2018) istraživali su utjecaj tlaka (10-100 bara) i temperature (60-200 °C) na TPC i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta, te su ustanovili da povećanje tlaka ne utječe statistički značajno ($p > 0,05$) na odzivne varijable uz primijenjenu temperaturu od 130 °C kroz 30 minuta. Tako je maksimalna vrijednost za DPPH postignuta pri 50 bara (155,83 mg TE g⁻¹ s. tv. ekstrakta), a za TPC (178,63 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta) i FRAP (131,40 mg TE g⁻¹ s. tv. ekstrakta) pri 80 bara. Za razliku od tlaka, ustanovljen je značajan utjecaj povećanja temperature na ekstrakcijski prinos sa 60 °C (143,89 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta) na 160 °C (174,61 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta), sa daljnjim trendom pada TPC vrijednosti pri 200 °C (160,60 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta), a što je vjerojatno posljedica degradativnih procesa primijenjene temperature. Vladić i sur. (2020) također su optimirali SWE tehniku ekstrakcije polifenola iz kore šipka (5-30 minuta, 100-220 °C) te su ustanovili bolji učinak kraćeg vremena (20 min) pri nižoj temperaturi (130 °C) u postizanju visokog ekstrakcijskog prinosa, uz istovremenu minimalizaciju udjela hidroksimetil furfurala kao degradacijskog produkta šećera uslijed reakcije dehidracije. Kvadratni učinak temperature (120-160 °C) i tlaka (10-15 MPa) na ekstrakciju ukupnih flavonoida iz ljuske kikirikija utvrđen je u radu Putra i sur. (2022), rezultirajući primjenom najniže temperature (120 °C) i tlaka (10,46 MPa), kao optimalnih procesnih varijabli za visoku ekstrakciju ukupnih flavonoida, a određen je i statistički značajan utjecaj protoka vode, tlaka i temperature ($p < 0,05$) na prinos promatranih spojeva.

5.2.4. Identifikacija polifenolnih spojeva trave ive

5.2.4.1. Primjena spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Identificirane polifenolne frakcije teupoliozida, stahizozida A te poliumozida pripadaju derivatima fenolnih kiselina, a karakterizirani su feniletilnom strukturnom jedinicom (najčešće hidroksitirozolom) koji tvori glikozidnu vezu s disaharidnim ili oligosaharidnim jedinicama, te fenilpropanoidnom jedinicom (najčešće fenolnom kiselinom), koja tvori estersku vezu s

glikonskim ostatkom. Obzirom da ove strukture generiraju gotovo identične prekursor ione uz vrlo slične fragmentacijske puteve (vrlo često se pojedine šećerne komponente u strukturama razlikuju samo u α -konfiguraciji ili β -konfiguraciji), NMR analiza je bila potrebna kako bi se jednoznačno utvrdila struktura izoliranih spojeva. U svrhu olakšavanja određivanja strukture izoliranih spojeva, napravljena je analiza analitičkih standarada ehinakozida i verbaskozida, te su očitani njihovi protonski i ugljikovi kemijski pomaci, konstante sprezanja i interakcije kroz prostor (NOE). Kod određivanja strukture nepoznatih spojeva PH5, PH6 i PH7, njihovi kemijski pomaci, konstante sprezanja i NOE kontakti uspoređivani su s onima analitičkih standarda ehinakozida i verbaskozida kao najpoznatijih predstavnika feniletanoidnih glikozida (Prilozi 30-32). NMR analiza je pokazala da je kod svih identificiranih spojeva aglikonski dio identičan, a čini ga kafeinska kiselina i hidroksitirozol.

Ehinakozid je glikozid kafeinske kiseline, a njegova struktura određena je 1982. godine pomoću NMR spektroskopije. Radi se o β -(3',4'-dihidroksifenil)-etil-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-[β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 6)]-(4-*O*-kafeoil)-glukopiranozidu (Becker i sur., 1982). *Verbaskozid* je po prvi puta strukturno okarakteriziran iste godine u radu Andary i sur. (1982), strukturno je vrlo sličan ehinakozidu, a glavna razlika je odsutnost β -D-glukopiranoze, inače vezane na položaj 6 centralne jedinice glukopiranoze u ehinakozidu.

Identificirana *frakcija 5*, odnosno *teupoliozid*, ima istu molekulsku formulu kao ehinakozid, a glavna strukturna razlika je odsutnost β -D-glukopiranoze na položaju 6 te prisutnosti šećerne jedinice na položaju 22 šećera α -L-ramnopiranoze (Prilog 17), a što je dokazano jakim ^1H - ^{13}C HMBC interakcijama između C11 i H22. Kemijski pomaci, konstante sprezanja, 2D NMR interakcije i NOE signali odgovaraju β -D galaktopiranozi koja poprima istu konformaciju stolice kao β -D-glukopiranoza. NMR podaci iz originalnog istraživanja nisu usporedivi s podacima u ovom radu budući da je korišteno drugačije otapalo (piridin/voda) (Oganesyan i sur., 1991). *Frakcija 6*, odnosno *stahizozid A*, također je ranije opisana u literaturi, a strukturno je vrlo slična *frakciji 5* obzirom na centralnu β -D glukopiranozu na kojoj je u položaju 3 vezana α -L-ramnopiranoza. Razlika je u prisutnosti treće šećerne komponente vezane na položaj 22 šećera α -L-ramnopiranoze (Prilog 23). Radi se o α -L-arabinopiranozi, što je ustanovljeno pomoću jakih interakcija između C11 i H22 u ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektru, kemijskim pomacima i konstantama sprega, 2D NMR interakcijama i NOE signalima. α -L-arabinopiranoza zauzima termodinamički stabilnu konformaciju prstena $^1\text{C}_4$ sa supstituentom 14OH u aksijalnom položaju. Očitani protonski i ugljikovi kemijski pomaci se slažu s literaturno dobivenim podacima (Nishimura i sur., 1991). Struktura identificirane *frakcije 7*, odnosno *poliumozida* (Prilog 29), sastoji se od α -L-ramnopiranoze vezane za centralnu šećernu

jedinicu β -D-glukopiranoze na položaju 6, a što je potvrđeno jakim ^1H - ^{13}C HMBC interakcijama između C11 i C6, kao i karakterističnim kemijskim pomacima, konstantama sprega, 2D NMR interakcijama i NOE signalima. Dodatno, na položaju 3 centralnog šećera nalazi se druga jedinica α -L-ramnopiranoze. Obje jedinice ramnoze zauzimaju istu $^1\text{C}_4$ konformaciju prstena. U ovom slučaju, dobiveni eksperimentalni NMR podaci nisu usporedivi s literaturnima obzirom na drugo korišteno otapalo (DMSO/TFA) (Andary i sur., 1985).

5.2.4.2. *Primjena spektrometrije masa visoke rezolucije spregnute s tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC-HR MS/MS)*

Analitički standardi ehinakozida i verbaskozida najprije su podvrgnuti UHPLC-HR MS/MS analizi, a u svrhu prikladne optimizacije uvjeta analize.

Za spoj **ehinakozid** ($\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$), dobiveni su sljedeći ion fragmenti: m/z 623,2200 (gubitak kafeoilnog ostatka), m/z 477,1603 (gubitak glukoze i ramnoze) i m/z 161,0245 (cijepanje kafeoilnog dijela), a poklapaju se s dostupnim literaturnim podacima. Dominantni prekursor ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ **verbaskozida** ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$) na m/z 623,1996 pokazao je sljedeći fragmentacijski uzorak: m/z 461,1665 (gubitak kafeoilne jedinice), m/z 315,1081 (gubitak kafeoilne jedinice i ramnoze), i m/z 161,0248 (kafeoilna jedinica-H₂₀). Spoj PH4 identificiran je kao **jionozid A** ($\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{O}_{20}$), s m/z 799,2697 kao prekursor ionom. Generirani fragment ion m/z 623,2192 upućuje na gubitak metilirane kafeoilne jedinice (176 Da), dok je nastanak fragmenta m/z 477,1605 vjerojatno posljedica gubitka glukoze (162 Da) i demetiliranog kafeoilnog ostatka (161 Da) (Li i sur., 2015). Usporedno s literaturnim podacima, spojevi PH5, PH6 i PH7 okarakterizirani su kao **teupoliozid** (m/z 785,2510, $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$), **stahizozid A** (m/z 755,2415, $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$) i **poliumozid** (m/z 769,2581, $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$) obzirom na prisutnost sljedećih fragment iona: m/z 161 (gubitak kafeoilne jedinice) i m/z 477,1609 (odcjepljenje glukoze i ramnoze) $[\text{M}-\text{H}-162-146]^-$ za spoj teupoliozid (Zhao i sur., 2020), m/z 161 (gubitak kafeoilne jedinice), m/z 461,1660, $[\text{M}-\text{H}-162-132]^-$, (gubitak glukoze i arabinoze) i m/z 315.1078 $[\text{M}-\text{H}-162-146-132]^-$ (prisutnost glukoze, ramnoze i arabinoze), za stahizozid A (Yang i sur., 2020), te m/z 161 (gubitak kafeoilne jedinice), $[\text{M}-\text{H}-162-146]^-$ (gubitak glukoze i ramnoze). PH9 je identificiran kao **forzitozid B** ($\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{O}_{19}$) uslijed generiranja prekursor iona $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 755,2409 i njegove daljnje fragmentacije na m/z 593,2080 $[\text{M}-\text{H}-\text{kafeoilna jedinica}]^-$, m/z 623,1980 $[\text{M}-\text{H}-\text{apiozil jedinica}]^-$, m/z 461,1656 $[\text{M}-\text{H}-\text{kafeoil-apiozil jedinica}]^-$, m/z 161,0241 $[\text{M}-\text{H}-\text{kafeoil-apiozil-glukozil-hidroksifeniletill}]^-$, i m/z 315,1079 $[\text{M}-\text{H}-\text{kafeoil-apiozil ramnozill}]^-$ (Li i sur., 2015). Fragmentacija spoja PH2 koja je rezultirala sljedećim ionima pri

m/z 753,2247, $[M-H-H_2O]^-$, m/z 661,1967 $[M-H-C_6H_6O_2]^-$, i m/z 591,1925 $[M-H-H_2O\text{-kafeoilna jedinica}]^-$, te m/z 179,0345 koji odgovara gubitku iona kafeinske kiseline, prema literaturi odgovara spoju s dominantnim prekursor ionom $[M-H]^-$ na m/z 771,2379, odnosno **β -OH-forzitozidu** ($C_{34}H_{44}O_{20}$) (Gong i sur., 2016). Frakcija PH10 ($C_{29}H_{35}O_{15}$) s prekursor ionom na m/z 623,1999 rezultirala je istim ion fragmentima kao verbaskozid, ali s drugačijim retencijskim vremenom na kromatografskoj koloni što ukazuje na prisutnost njegovog izomera, tj. **izoverbaskozida** (Gong i sur., 2016).

Nadalje, potvrđena je prisutnost tri flavonoida u uzorcima trave ive, uključujući jedan flavon-C-glikozid, tj. vicenin-2, i dva flavonoid-O-ramnoglukozida, tj. diosmin i akacetin-7-O-rutinozid. Sva tri spoja već su identificirana u proučavanoj biljnoj vrsti (Mitreski i sur., 2014; Harborne i sur., 1986). **Vicenin-2** (PH1) ili apigenin-6,8-di-C- β -D-glukozid ($C_{27}H_{30}O_{15}$) identificiran je na temelju dominantnog prekursor iona generiranog pri m/z 593,1532 i fragmenata karakterističnih za C-diglukozilflavone kako slijedi: m/z 503,1192, m/z 473,1095, m/z 383,0773, m/z 353,0669, m/z 325,0716 i m/z 191,0346 (Keskes i sur., 2018; Wen i sur., 2016). Dobiveni ion fragmenta pri m/z 473,1095 rezultat je unakrsnog cijepanja ostatka heksoze i vode u flavon-C-glikozidima $[M-H-120]^-$. Potvrđena je prisutnost apigenina (Apg) stvaranjem karakterističnih fragmenata na m/z 383,0773 $[Apg+113]^-$ i m/z 353,0669 $[Apg+83]^-$ (Zhang i sur., 2017; Ferreres i sur., 2003). Ovaj flavon-C-glikozid nije identificiran u SWE ekstraktima trave ive. PH12 i PH13, koji su eluirani kao najnepolariji u usporedbi s prethodno proučavanim spojevima, okarakterizirani su kao **diosmin** ($C_{28}H_{32}O_{15}$, diosmetin-7-O rutinozid) i **akacetin-7-O-rutinozid** ($C_{28}H_{32}O_{14}$) u HAE, MAE i SWE ekstraktima. Cijepanje glikozidne veze od prekursor iona diosmina (m/z 607,1668) i akacetin-7-O-rutinozida (m/z 591,1737) doveli su do stvaranja iona fragmenta m/z 299,0558, odnosno m/z 283,0620. Nadalje, gubitak metilnih skupina (15 Da) rezultirao je stvaranjem manjih fragmenata iona na m/z 284,0322, odnosno m/z 268,037 (Zhao i sur., 2020; Parejo i sur., 2004).

5.2.5. Polifenolni sastav uzoraka trave ive

U cilju odabira ekstrakta najizraženijeg bioaktivog potencijala obzirom na udjel TPC-a, rezultate antioksidacijskog kapaciteta kao indikatore sposobnosti "gašenja" ABTS i DPPH slobodnih radikala te najvažnije, udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva, svih šest uzoraka trave ive podvrgnuto je konvencionalnoj te inovativnim tehnikama ekstrakcije prema prethodno optimiranim uvjetima.

Dobiveni rezultati za sve analizirane vodene ekstrakte ukazuju na neznatno veći udjel TPC-a za HAE (46,16-71,60 mg GAE g⁻¹ s. tv.) u odnosu na MAE (46,52-71,80 mg GAE g⁻¹ s. tv.), a što ukazuje na visoku ekstrakcijsku učinkovitost MAE obzirom na skraćanje vremena ekstrakcije za približno 3,3 puta u odnosu na HAE. Sličan trend može se uočiti kod ABTS (HAE: 0,221-0,547 mmol TE g⁻¹ s. tv., MAE: 0,206-0,329 mmol TE g⁻¹ s. tv) i DPPH (HAE: 0,209-0,338 mmol TE g⁻¹ s. tv. g⁻¹, MAE: 0,171-0,331 mmol TE g⁻¹ s. tv.) rezultata. U ovom slučaju, primjena relativno visokog omjera uzorka i otapala od 1 g : 100 mL i temperature od 90 °C s vodom kao otapalom, značajno je poboljšala difuziju mase ciljanih spojeva kao posljedice nagle i učinkovite pretvorbe kinetičke energije u sustavu otapala i uzorka uslijed dipol dipol rotacija u elektromagnetskom polju. Rezultati dostupnih istraživanja ukazuju na slične ili relativno niže detektirane udjele i TPC-a i antioksidacijskog kapaciteta, obzirom da su svi rezultati „koncentrirani”, odnosno izraženi na suhu tvar ekstrakta, a ne na suhu tvar biljnog materijala kao što je navedeno u ovom radu (primjerice, suha tvar ekstrakta trave ive u našem slučaju iznosi tek 0,28 %). Osim distinktivnog sastava biljnog materijala obzirom na lokalitet, sezonu, period berbe, fenološku fazu rasta i sl., a što je i glavni izazov u industrijskoj standardizaciji biljnog materijala, mogući razlog nižeg ekstrakcijskog prinosa u odnosu na ovaj rad, svakako može biti primjena relativno nisko učinkovite tehnike maceracije nepotpomognute toplinom, kao i manjeg omjera uzorka i otapala. Priprema ekstrakta trave ive u većini dostupnih radova bazirana je na maceraciji kroz 24/48 sati u alkoholno-vodenim otapalima pri sobnoj temperaturi, a dobiveni udjeli TPC-a iznosili su: 136,97 mg GAE g⁻¹ na suhu tvar vodenog ekstrakta te 214,75 mg GAE g⁻¹ na suhu tvar metanolnog ekstrakta (Bektašević i sur., 2023), 70,34 mg ekv. klorogenske kiseline g⁻¹ na s. tv. acetonskog ekstrakta te 149,16 mg ekv. klorogenske kiseline g⁻¹ na s. tv. metanolnog ekstrakta (Stanković i sur., 2012b), 66,52 mg GAE g⁻¹ s. tv. odnosno 190,20 mg GAE g⁻¹ s. tv. metanolnog ekstrakta (Zlatić i sur., 2017). Vujanović i sur. (2019) odredili su udjel TPC-a u MAE ekstraktu (5 g : 150 mL, 50 %-tni etanol, v/v, 30 minuta pri 450 W) u iznosu od 73,60 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta. Nadalje, svi SWE ekstrakti su u ovom radu rezultirali značajno višim udjelom TPC-a (84,50-109,55 mg GAE g⁻¹), kao i antioksidacijskog kapaciteta u rasponu od 0,336-0,427 mmol TE g⁻¹ (p<0,05). Nastić i sur. (2018) također su primijenili SWE ekstrakciju na nadzemnom materijalu trave ive (60-200 °C, 1g : 10 mL, 30 min), uz dobiveni niži udjel TPC-a, u odnosu na rezultate ovog rada (143,89-174,61 mg GAE g⁻¹ s. tv. ekstrakta), kao i DPPH antioksidacijskog kapaciteta (0,371-0,568 mmol TE g⁻¹ s. tv. ekstrakta). U istom radu primijećeno je smanjenje DPPH antioksidacijskog kapaciteta pri 200 °C kao posljedica degradacije polifenolnih spojeva pirolizom. S druge strane, nije uvijek prisutna pozitivna korelacija između rezultata antioksidacijskog kapaciteta i

pojedinačnih udjela polifenolnih spojeva (Atanasova i sur., 2023), obzirom da hidrolizom polifenolnih spojeva pri odgovarajućim eksperimentalnim uvjetima može doći do reakcija neoformacije i Maillardovih reakcija pri čemu se generiraju različiti produkti koji također mogu biti nosioci antioksidacijskog kapaciteta (Plaza i sur., 2010).

Prema rezultatima udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva, ehinakozid (EHI) i stahizozid A (STACH A) pokazali su se dominantnim feniletanoidnim glikozidima u HAE ekstraktima TI_1 (EHI: 9,10 mg ekv. EHI g⁻¹, STACH A: 10,57 mg ekv. EHI g⁻¹), TI_2 (EHI: 23,54 mg ekv. EHI g⁻¹, STACH A: 13,39 mg ekv. EHI g⁻¹) i TI_5 (EHI: 8,90 mg ekv. EHI g⁻¹, STACH A: 8,89 mg ekv. EHI g⁻¹). HAE ekstrakti uzorka TI_4 (TEU: 19,56 mg ekv. EHI g⁻¹) i TI_6 (21,02 mg ekv. EHI g⁻¹) rezultirali su visokim udjelima teupoliozida od čak 1,96-2,10 % na s. tv. biljnog materijala, a dodatno je u HAE ekstraktu uzorka TI_6 određen i ekvivalentan udjel stahizozida A (STACH A: 21,33 mg ekv. EHI g⁻¹). Premda je HAE ekstrakt TI_5 rezultirao najmanjim ukupnim udjelom feniletanoidnih glikozida (30,36 mg ekv. EHI g⁻¹), pokazao se vrijednim izvorom poliumozida (21,72 mg ekv. EHI g⁻¹) koji predstavlja 72 % udjela ukupno određenih feniletanoidnih glikozida. HAE ekstrakti svih uzoraka trave ive rezultirali su relativno visokim udjelima verbaskozida (3,13-7,90 mg ekv. EHI g⁻¹), kao i već spomenutih feniletanoidnih glikozida, a koji nisu određeni kao najdominantiji u pojedinim uzorcima. MAE ekstrakti svih uzoraka trave ive slijedili su isti trend određenih pojedinačnih udjela kao što je prethodno navedeno za HAE ekstrakte, samo s nešto manjim kvantitativnim udjelima. Međutim, SWE ekstrakti svih uzoraka trave ive pokazali su se siromašnim izvorima prethodno spomenutih derivata kafeinske kiseline, sa smanjenim ukupnim udjelom za čak 85 %, ovisno o uzorku (4,62-21,32 mg ekv. EHI g⁻¹). Zanimljivo je uočiti obrnuto proporcionalan trend između izmjerenih udjela ukupnih TPC-a i antioksidacijskog kapaciteta, te određenih pojedinačnih udjela prisutnih polifenolnih spojeva u svim SWE ekstraktima, a što se može objasniti modificiranim fizikalno-kemijskim svojstvima vode pri 200 °C pod povišenim tlakom odnosno značajno sniženom dielektričnom konstantom koja pogoduje ekstrakciji polifenola relativno nepolarnijeg karaktera (Ko i sur., 2014; Cvetanović i sur., 2015). Nadalje, značajno veći udjel TPC-a i antioksidacijskog kapaciteta u SWE ekstraktima u odnosu na HAE i MAE ekstrakte može se objasniti: i) hidrolizom glikozidne veze feniletanoidnih glikozida i drugim razgradnim procesima te uključivanjem njihovih razgradnih produkata u reakcije neoformacije, pri čemu mogu nastati produkti očuvanog ili većeg antioksidacijskog kapaciteta, ii) nastankom Maillardovih spojeva reakcijom aminokiselina sa šećerima matriksa ili produkata karamelizacije uslijed pirolize, očuvanog ili uvećanog antioksidacijskog kapaciteta te prisutnih reducirajućih svojstava (Ravber i sur. 2015; Gu i sur., 2009).

Među limitirajućim podacima vezanima za određene udjele feniletanoidnih glikozida u travi ivi, jedino se nalazi istraživanje Mitreski i sur. (2014), u kojem su određeni niži ukupni udjeli ukupnih feniletanoidnih glikozida ($24,5 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv. biljnog materijala) u metanolnom ekstraktu trave ive iz makedonske flore, uključujući kareluscenozid ($7,0 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.), kastanozid A ($1,1 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.), ehinakozid ($2,4 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.), forzitozid B ($10,2 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.), verbaskozid ($2,0 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.) i samiozid ($1,7 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.). Nadalje, u SWE ekstraktu (60-200 °C, 1 g : 10 mL, 30 minuta) iz trave ive prikupljene na lokalitetu Srbije (Nastić i sur., 2018), nije detektiran niti jedan spoj iz te skupine spojeva u odnosu na ovaj rad, dok su kvantificirane samo fenolne kiseline (galna, kafeinska, klorogenska, protokatehinska, vanilinska, ferulinska kiselina) te flavonoidi (rutin, naringin, katehin, epikatehin). Obzirom na dostupna istraživanja vezana za dosad kvantificirane udjele flavonoida u travi ivi, mogu se uočiti značajna odstupanja u odnosu na rezultate ovog rada. Svi HAE, MAE te SWE ekstrakti trave ive rezultirali su podjednako zanemarivim udjelima vicenina-2 ($0,27\text{-}0,75 \text{ mg ekv. rutina g}^{-1}$ s. tv.), diosmina ($0,37\text{-}0,66 \text{ mg ekv. diosmetina g}^{-1}$ s. tv.) i akacetin-7-*O*-rutinozida ($0,15\text{-}0,54 \text{ mg ekv. akacetina g}^{-1}$ s. tv.) dok, primjerice, u uzorku TI_3 nije identificiran niti vicenin-2 niti akacetin-7-*O*-rutinozida, kao ni vicenin-2 u SWE ekstraktima. Mitreski i sur. (2014) također su detektirali niži udjel ukupnih flavonoida ($2,2 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv.) u metanolnom ekstraktu trave ive u usporedbi s udjelom feniletanoidnih glikozida, a rutin, luteolin i apigenin-7-*O*-glikozid detektirani su kao najzastupljeniji spojevi. Što se tiče kvantifikacije flavonoida u SWE ekstraktima, Nastić i sur. (2018) kvantificirali su naringin ($996 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta), rutin ($125 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta) i epikatehin ($120 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta). Poznato je da glikozilirani flavonoidi, kao i flavonoidi s dominantnim hidroksilnim skupinama, imaju veću učinkovitost ekstrakcije na relativno niskoj temperaturi, te da se lakše razgrađuju na višim temperaturama od njihovih aglikona obzirom na niže talište (Cvetanović i sur., 2019; Ko i sur., 2014).

Prema dosad provedenim istraživanjima, biljne vrste *Ehinacea spp.* i *Clerodendrum spp.* (rod *Lamiaceae*), *Orobancha spp.*, *Phelipanche spp.*, *Cistanche spp.* i endemične kineske vrste *Rehmannia spp.* (rod *Orobanchaceae*) *Barleria spp.* (rod *Acanthaceae*), *Aloysia spp.* i *Callicarpa spp.* (rod *Verbenaceae*) te *Lagopsis spp.* (rod *Labiatae*) najpoznatiji su izvori različitih feniletanoidnih glikozida, s naglaskom na dosad najistraživanije predstavnike, poput ehinakozida, verbaskozida (akteozida), poliumozida i forzitozida B (He i Yang, 2021; Lee i sur., 2016; Liu i sur., 2018; Lu i sur., 2013; Uddin i sur., 2020; Lepojević i sur., 2017; Skalski i sur., 2021; Marchetti i sur., 2019; Piątczak i sur., 2015). Većina biljnih vrsta iz prethodno navedenih rodova koristi se u komercijalnim multikomponentnim preparatima tradicionalne kineske medicine (TCM). Tako su primjerice, verbaskozid ($688,74 \text{ mg g}^{-1}$ s. tv. ekstrakta) i

poliumozid (467,90 mg g⁻¹ s. tv. ekstrakta) utvrđeni kao glavni feniletanoidni glikozidi u *Orobanche caryophyllacea*, odnosno *Phelipanche ramosa* u metanolnim ekstraktima (Skalski i sur., 2021). *Ehinacea pallida* (12,7 mg g⁻¹ s. tv.) te *Ehinacea angustifolia* (10,6 mg g⁻¹ s. tv.) poznati su izvori ehinakozida (Lepojević i sur., 2017), dok je primjerice, *Cistanche deserticola* komercijalno visokovrijedan izvor verbaskozida (0,8-31,4 mg g⁻¹ s. tv.) i ehinakozida (2,3-27,1 mg g⁻¹ s. tv.), kao i *Cistanche salsa* (VERB: 2,12-75,44 mg g⁻¹ s. tv., EHI: 0,91-144,61 mg g⁻¹ s. tv.), dok je u *Cistanche sinensis* detektiran poliumozid u rasponu od čak 3,4-36,2 mg g⁻¹ s. tv. (Yang i sur., 2013; Liu i sur., 2018; Lu i sur., 2013). Gong i sur. (2016) odredili su forzitoid B (0,447-18,044 mg g⁻¹), poliumozid (0,231-26,872 mg g⁻¹) te verbaskozid (1,805-9,396 mg g⁻¹) kao spojeve s najvećim udjelom u ispitanim uzorcima *Callicarpa kwangtungensis* s 11 lokaliteta u Kini. Istraživanja vezana za spojeve teupoliozid i stahizozid A (syn. *lavandulifoliozid A*) uglavnom su limitirana te ograničena na identifikaciju (He i Yang, 2021). Iznimno, u istraživanju Esposito i sur. (2020) kvantificiran je teupoliozid u udjelu od 2,8 % na s. tv. ekstrakta. Korelacijom prethodno navedenih podataka i podataka dobivenih u ovom eksperimentalnom istraživanju, jasno se zaključuje da je trava iva sakupljena s različitih lokaliteta iz Primorske Hrvatske, nedovoljno poznat i visokovrijedan izvor feniletanoidnih glikozida, osobito ehinakozida, teupoliozida, poliumozida, stahizozida A i verbaskozida.

Sukladno navedenome, trava iva nosi velik komercijalni potencijal za biotehnošku proizvodnju ekstrakata bogatih derivatima hidroksicimetnih kiselina. Talijanska tvrtka Active Botanical Research, osnovana 2012. godine, već je uspješno integrirala svoju patentiranu NATRISE® biotehnošku platformu u proizvodnji liofiliziranih ekstrakata, komercijalnih naziva TEUPOL 10P/50P, ACTEOS 10P te ECHINAN 4P iz tradicionalnih biljnih kultura *Ajuga reptans* (puzava ivica) standardizirane na teupoliozid (10 i 50 %), *Lippia citriodora* (limunska verbena) standardizirane na akteozid/verbaskozid (10 %), odnosno *E. angustifolia* (uskolisna ehinaceja) standardizirane na ehinakozid (4 %) (Anonymus, 2024e). NATRISE® industrijskom tehnologijom moguće je proizvesti ekološki održive biljne ekstrakte, bez toksičnih metala, standardizirane kvalitete i uniformnog prinosa. Proizvodnja se zasniva na izolaciji ciljanih biljnih dijelova, indukciji stanične proliferacije i kalogeneze, selekciji populacije stanica od interesa i amplifikaciji istih stanica za proizvodnju aktivnih spojeva u visokokontroliranim uvjetima. Tako su proizvođači ORAC metodom odredili oko 3 puta veći antioksidacijski kapacitet proizvoda TEUPOL 50P (511 mmol TE 100 g⁻¹) u odnosu na koncentrirani ekstrakt kurkume (159 mmol TE 100 g⁻¹). Nadalje, TEAC metodom odredili su antioksidacijski kapacitet istog proizvoda od 1,9 U TE, usporedivši ga s antioksidacijskim kapacitetom komercijalnih antioksidansa, poput vitamina C (1,1 U TE ili rutina (1,5 U TE).

5.3. *In vitro* biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive

5.3.1. Citotoksični/proliferativni učinak na kontinuirane humane stanične linije

Jedan od ključnih indikatora biološke aktivnosti ciljanog spoja ili smjese bioaktivnih spojeva, upravo je svojstvo citotoksičnog ili proliferativnog učinka na određenim staničnim linijama koje ovisi o primijenjenoj koncentraciji i duljini tretmana.

Statistički značajan ($p < 0,05$) proliferativni učinak utvrđen je na Caco-2 stanicama nakon dva sata tretmana pri koncentracijama ekstrakta od 0,025 i 0,500 mg mL⁻¹, dok je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje Caco-2 i AGS vijabilnih stanica, odnosno citotoksični učinak utvrđen nakon produljenog vremena tretmana (24 sata) pri svim koncentracijama ekstrakta trave ive (0,025, 0,050, 0,150 i 0,500 mg mL⁻¹). S druge strane, Stanković i sur. (2011a) ustanovili su dozno ovisan citotoksični učinak metanolnog macerata trave ive u rasponu koncentracija 0,050-1 mg mL⁻¹ na HCT-116 stanice karcinoma debelog crijeva. Primjenom MTT testa, nakon 24 sata tretmana uočen je značajan citotoksični učinak ekstrakta pri svim koncentracijama koji se nije dodatno pojačao nego je, ili ostao isti, ili je nakon 72 sata prešao u snažan proliferativni učinak stimuliran najnižom primijenjenom koncentracijom ekstrakta (0,050 mg mL⁻¹). U obzir svakako treba uzeti znatno duže vrijeme izlaganja, metanol kao ekstrakcijsko otapalo, staničnu liniju i drugačiji tip testa za određivanje citotoksičnosti. Dodatno, u radu Stanković i sur. (2015) isto pripremljenim ekstraktom trave ive tretirane su humane stanice melanoma (Fem-x), stanice humanog adenokarcinoma dojke (MDA-MB-361), stanice kronične mijelogenozne leukemije (K562) te stanice adenokarcinoma grlića maternice (HeLa), pri čemu je detektiran izražen dozno i o tipu stanične linije ovisan citotoksični učinak ekstrakta testiranog u rasponu od 0,0125-0,200 mg L⁻¹. Najveća koncentracija ekstrakta rezultirala je i najjačim antitumorskim učinkom na K562 i HeLa stanice smanjivši njihovu vijabilnost tijekom 72 sata pri koncentraciji 0,200 mg L⁻¹ za 97 %, odnosno ~85 %. Nadalje, zanimljivo je spomenuti i rezultate tretmana humanih normalnih imunokompetentnih krvnih stanica (PBMC) i proliferacijski stimuliranih krvnih stanica (PBMC-PHA) fitohemaglutininom (uvjetuje zgrušavanje leukocita) u istom radu, s istom koncentracijom ekstrakta trave ive, pri čemu je smanjenje vijabilnosti ispitivanih stanica detektirano jedino na PBM-PHA za 20 %, a što ukazuje na selektivnost polifenolnog ekstrakta prema specifičnim staničnim linijama, a time i modulirajući antitumorski učinak.

Citotoksični učinak ekstrakta trave ive na AGS, Caco-2 te HepG2 stanice pri najvećoj koncentraciji i tijekom 24 sata izlaganja, djelomično se može povezati sa prisutnošću

feniletanoidnih glikozida koji predstavljaju oko 22 % liofiliziranog ekstrakta trave ive korištenog u ovom radu, pri čemu ehinakozid čini otprilike 40 % njihovog ukupnog udjela. Tako je utvrđen značajan porast antiproliferativne aktivnosti povećanjem koncentracije ehinakozida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ -9,57 %; $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ -26,67 %; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ -37,20 %) na HepG2 stanice putem inaktiviranja signalnog puta proteina kinaze B ili AKT signalnog puta i umanjenja ekspresije receptora izraženog na mijeloidnim stanicama-TREM2 (Ye i sur., 2019). Ne treba isključiti niti utjecaj ostalih spojeva iz iste skupine, poput verbaskozid (~13 % na masu liofilizata). Provedeno je istraživanje koje je uvrđilo jači citotoksični učinak verbaskozida (23-30 %) u odnosu na ehinakozid (10-18 %) i kalkeolariozid A (13-18 %) i B (5-15 %) (Mulani i sur., 2014). U istraživanju Attia i sur. (2018) utvrđen je značajan citotoksični učinak verbaskozida pri tretiranom rasponu 0,01-100 μM na Caco-2 (smanjena vijabilnost stanica za 70 %) i HCT-116 (smanjena vijabilnost stanica za 80 %) stanice, a kombinacija doze verbaskozida od 0,1 μM i 10 μM fluorouracila kao standardnog kemoterapeutika rezultirala je značajnim sinergističkim citotoksičnim učinkom (Caco-2: 80 %, HCT-116: 90 %). Brojna istraživanja također potvrđuju antiproliferativni učinak drugih biljnih ekstrakata bogatih feniletanoidnim glikozidima. Tako su Yuan i sur. (2021) utvrdili koncentracijom (200 - $600 \mu\text{g mL}^{-1}$) i vremenom (24 i 48 sati) uvjetovano citotoksično djelovanje ekstrakta *Cistanche tubulosa* (28 % ehinakozida, 9,9 % verbaskozida, 34,8 % ukupnih polisaharida) na BEL-7404 i HepG2 stanice karcinoma jetre kroz indukciju zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze, povezanima s aktivacijom MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) signalnog puta. Utvrđena je i povećana efikasnost antitumorskih svojstava konvencionalnog kemostatika cisplatina uz smanjenje nuspojava, kao i samostalna citotoksična uloga ispitivanog ekstrakta kroz direktno antiproliferativno djelovanje i indirektno poboljšanje imunološkog odgovora.

5.3.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak na kontinuirane humane stanične linije

U cilju utvrđivanja korelacije između preživljenja stanica tretiranih ekstraktom i smanjenja, odnosno povećanja udjela generiranih visoko reaktivnih kisikovih radikala (ROS), provedena je i analiza antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja.

Osim što se indukcija slobodnih radikala značajno razlikovala ovisno o tretiranoj staničnoj kulturi, uočen je dozno ovisan učinak ekstrakta. Statistički značajno ($p < 0,05$) prooksidacijsko djelovanje na CAL27 nakon kraćeg tretmana (2 sata) ustanovljeno je jedino kod $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$, dok je nakon 24 sata došlo do obrnutog učinka, tj. do smanjenja generiranja ROS-ova za čak 72 % ($p < 0,05$). Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta prilikom tretiranja AGS

stanica vidljivo je samo nakon 24 sata pri 0,050 mg mL⁻¹. Kod Caco-2 stanica, utvrđeno je statistički ($p < 0,05$) značajno antioksidacijsko djelovanje ekstrakta trave ive pri 0,050 mg mL⁻¹ nakon dva sata tretmana, a koje se nastavilo i nakon produljenog vremena izlaganju (24 sata), dok je koncentracija ekstrakta od 0,500 mg mL⁻¹ pokazala statistički značajno ($p < 0,05$) antioksidacijsko djelovanje samo nakon dva sata. Suprotno tome, nakon 24 sata utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$) prooksidacijski učinak koncentracije od 0,500 mg mL⁻¹. Kod HepG2 stanica vidljivo je statistički značajno ($p < 0,05$) antioksidacijsko djelovanje tijekom produljene inkubacije stanica (24 sata) u odnosu na kraće izlaganje ekstraktu, pri čemu su koncentracije ekstrakta od 0,050 i 0,500 mg mL⁻¹ rezultirale najizraženijim učinkom, odnosno smanjenjem generiranja ROS-ova za oko 60, odnosno 54 %.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji statistički značajan ($p < 0,05$) trend između antioksidacijskog učinka ekstrakta i produljenog vremenskog izlaganja (24 sata) kod CAL27, HepG2 i Caco-2 staničnih linija. Nadalje, nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) ovisnost generiranja ROS-ova o smanjenju vijabilnosti stanica na ispitane stanične linije, u odnosu na kontrolu. S druge strane, može se primjetiti da je kod HepG2 stanica pri svim koncentracijama, kao i djelomično kod CAL27 te Caco-2, primijećeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje indukcije reaktivnih radikala, dok je postotak preživljenja stanica (%) ostao relativno nepromijenjen. Sličan trend uočen je i u istraživanju Stanković i sur. (2011a) u kojem je ispitivana korelacija između povećanog generiranja superoksidnih (O_2^-) te nitritnih radikala (NO_2^-) i smanjenja proliferacije tumorskih stanica debelog crijeva HCT-116 u prisutnosti metanolnog ekstrakta trave ive (0,050-1 mg mL⁻¹). Rezultati nisu ukazali na statistički značajno povećanje generiranih radikala dok je pri istom vremenskom tretmanu (72 sata) uočen porast vijabilnih stanica pri nižim koncentracijama, a što navodi na odsutnost antiproliferativnog učinka. Živanović i sur. (2016) proučavali su migracijski potencijal ekstrakta trave ive (1-100 μ g mL⁻¹) na humane stanične linije kolorektalnog karcinoma SW-480 i karcinoma dojke MDA-MB-231 u ovisnosti o promjeni redoks statusa mjenjenog koncentracijama reduciranog glutaciona (GSH), O_2^- i NO_2^- slobodnih radikala nakon 24 i 72 sata tretmana. Migracijski potencijal je prvi korak pri metastaziranju karcinoma te prelaskom u okolna tkiva i krvnu cirkulaciju stvara uvjete za tvorbu sekundarnih tumora. Rezultati su ukazali da jedino najmanja koncentracija ekstrakta (1 μ g mL⁻¹ na SW-480; 10 μ g mL⁻¹ na MDA-MB-231) smanjuje migracijski potencijal, dok daljnjim povećanjem koncentracije dolazi do suprotnog učinka. Također, nije ustanovljena korelacija između smanjenja migracijskog potencijala i prooksidacijskog učinka ekstrakta kroz povećano generiranje ispitivanih radikala,

a što upućuje na moguću modulaciju migracije tumorskih stanica kroz mehanizme neovisne o redoks statusu.

Polifenoli posjeduju dualni karakter, odnosno antioksidacijsku i prooksidacijsku prirodu, a koja uvelike ovisi o fiziološkim uvjetima stanice, kemijskoj strukturi (broj hidroksilnih, acetilnih skupina, konjugiranih veza, kelirajuća sposobnost i sl.), prisustvu metalnih iona, biodostupnosti i dr. (Babich i sur., 2011). Poznato je da polifenoli imaju mogućnost vrlo selektivnog prooksidacijskog djelovanja na stanice karcinoma indukcijom nastanka slobodnih radikala rezultirajući toksičnim učinkom i staničnom smrću, pritom ne oštećujući normalne stanice. S druge strane, njihova antioksidacijska uloga je nešto detaljnije razjašnjena, a zasniva se na uklanjanju i smanjenju generiranja slobodnih radikala što je primarna uloga u regulaciji oksidacijskog stresa i prevenciji nastanka karcinoma. Odsutnost pozitivne korelacije između indukcije ROS-ova i citotoksičnog učinka prilikom tretmana ekstraktom trave ive djelomično se može objasniti eksprimiranim antioksidacijskim svojstvima ekstrakta nakon 24 sata tretmana, poput sposobnosti keliranja metala u kanceroznom okruženju, aktivacije obrambenog sustava i regeneracije stanica (Stanković i sur., 2011a). U tom kontekstu, može se djelomično zaključiti da polifenolni spojevi ekstrakta trave ive imaju preventivnu ulogu u sprječavanju patogeneze u odnosu na njenu indukciju, a što se može iskoristiti u kemopreventivne svrhe (Cardinali i sur., 2012). Za razliku od nekih fenolnih kiselina (galna, elaginska) i flavonoida (epigalokatehin galat, rutin, miricetin, resveratrol) za koje je dokazana i antioksidacijska i prooksidacijska uloga, dostupna istraživanja na različitim feniletanoidnim glikozidima, poput ehinakozida i salidrozida, upućuju upravo na njihovu preventivnu, antioksidacijsku ulogu kroz redukciju lipidne peroksidacije, poboljšanje mitohondrijskih funkcija, inhibiciju oksidacijskog stresa, poboljšanje interstanične komunikacije, regulaciju MAPK signalnog puta, kao jedne od temeljnih kaskadnih reakcija u proliferaciji, diferencijaciji, preživljavanju i apoptozi upalnih stanica (eng. *mitogenactivated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase*) i dr. (Bian i sur., 2021; Wang i sur., 2024).

5.3.3. Bakteriostatski/proliferativni učinak na predstavnike humane mikrobiote

U cilju uvida u potencijal ekstrakta trave ive kao bakteriostatskog agensa, određen je postotak preživljenja bakterijskih kultura *E. coli*, *S. aureus* te *L. plantarum* prilikom izlaganja ekstraktu tijekom 60 minuta.

Utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$) učinak svih primijenjenih koncentracija ekstrakta na smanjenje vijabilnosti stanica *E. coli*, međusobno uspoređenih i u odnosu na kontrolu, a koncentracija od $0,150 \text{ mg mL}^{-1}$ pokazala je najpotentniji učinak, inhibirajući rast za 64 % ($p < 0,05$). Premda je uočen statistički značajan ($p < 0,05$) inhibitoran učinak ekstrakta trave ive na rast stanica *S. aureus* pri koncentracijama od 0,025, 0,150 i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), isti se pokazao relativno niskim (inhibicija rasta za samo 10-20 %). Kod *L. plantarum*, detektirano je statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) vijabilnosti bakterija pri višim koncentracijama ($0,150$ i $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$).

Uočeni potencijal inhibicije *E. coli* pri tretmanu ekstraktom trave ive svakako predstavlja rezultat od najvećeg interesa za daljnja istraživanja, obzirom na poznate činjenice vezane za visoku antimikrobnu rezistentnost ove Gram-negativne bakterije, a koja se značajno očituje u sposobnosti sudjelovanja *E. coli* u predaji svojih, ali i primanju i akumuliranju rezistentnih gena od drugih mikroorganizama u životnom okolišu (Poirel i sur., 2018). Nadalje, visoka rezistentnost Gram-pozitivne *S. aureus* također predstavlja izazove u pronalasku alternativnih antibakterijskih agenasa obzirom na postojanje debelog peptidoglikanskog sloja otpornog na oštećenja (Silhavy i sur., 2010). Dosadašnja istraživanja također su potvrdila antimikrobnu aktivnost metanolnih polifenolnih ekstrakata dobivenih iz drugih Lamiaceae vrsta, poput mente (*Mentha pulgeum*), marulje (*Marrubium vulgare*), cjelolisne ivice (*Ajuga iva*) i dubčca (*T. polium*), u odnosu na galnu i taninsku kiselinu kao standarde. Pozitivna korelacija povećanja zone inhibicije i određene MIC koncentracije za *E. coli* i *S. aureus* utvrđena je u ovisnosti o određenim udjelima ukupnih TPC, tanina, ukupnih flavonoida i antioksidacijskom kapacitetu (Khaled-Khodja i sur., 2014). Nadalje, ekstrakt jeruzalemske kadulje (*Phlomis fruticosa L.*) s detaljno okarakteriziranim kvalitativnim profilom pomoću HR MS-MS, pri čemu je utvrđena prisutnost feniletanoidnih glikozida (9 spojeva), flavonoida (16 spojeva) i fenolnih kiselina (15 spojeva), pokazao je umjerenu bakteriostatsku aktivnost prema *S. aureus* i *E. coli*, ali i baktericidno djelovanje prema soju meticilin-rezistentnoj *S. aureus*, za razliku od komercijalnog antibiotika ampilicina koji nije pokazao niti inhibitorno djelovanje (Stojković i sur., 2021). S druge strane, metodom agar difuzije u istom radu, detektirana je veća antimikrobna aktivnost metabolita forzitozida A, točnije hidroksitirosola i dihidrokafeinske kiseline, protiv *S. aureus* od same testirane komponente, a što djelomično upućuje i na nizak bakteriostatski učinak ekstrakta trave ive bogatog feniletanoidnim glikozidima. Međutim, najnovija saznanja vezana za antimikrobne učinke ovih spojeva upućuju na, primjerice, sinergistički učinak verbaskozida s komercijalnim antibioticima vankomicinom i ceftazidimom

u inhibiciji određenih sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Shi i sur., 2022), ili inhibitorni utjecaj ehinakozida u kombinaciji s vankomicinom na aktivnost *S. aureus* (Jiang i sur., 2023).

5.3.4. Genotoksični/genoprotektivni učinak na kontinuirane humane stanične linije i modelnu DNK

Za procjenu potencijala ekstrakta trave ive da izazove oksidacijskog oštećenja DNK ispitivanih humanih staničnih linija, analizirani su parametri dužine i intenziteta repa.

Kod CAL27 stanica, nije vidljiv statistički značajan ($p > 0,05$) ni genotoksični niti genoprotektivni učinak pri testiranim koncentracijama ekstrakta trave ive. Kod ostalih staničnih linija, izdvajaju se koncentracije od 0,050 i 0,500 mg mL⁻¹ kao statistički značajne ($p < 0,05$) u mogućem genoprotektivnom ili genotoksičnom djelovanju. Tako je primjerice kod AGS stanica detektirano statistički značajno ($p < 0,05$) genoprotektivno djelovanje ekstrakta trave ive pri koncentracijama od 0,025 i 0,050 mg mL⁻¹, obzirom na smanjenje veličine oštećenja (dužine repa) nakon kraćeg vremena tretmana, a koje se prolongiralo i 24- satnim tretmanom. Za razliku od AGS stanica, tretman ekstraktom pokazuje genotoksični učinak na Caco-2 stanice, obzirom na statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) veličine izmjerenih DNK fragmenata (dužina repa) nakon 2 sata pri koncentraciji od 0,050 mg mL⁻¹, u odnosu na kontrolu. Kod HepG2 tijekom kraćeg vremenskog izlaganja (2 sata), primijećen je statistički značajan ($p < 0,05$) genotoksični učinak ekstrakta, analizom rezultata dužine repa, pri čemu su se opet istaknule koncentracije od 0,050 i 0,500 mg mL⁻¹. Prema izmjernom intenzitetu repa, može se uočiti povećanje udjela oksidacijskih oštećenja DNK nakon prolongiranog tretmana (24 sata) pri koncentracijama od 0,050 i 0,150 mg mL⁻¹.

Oksidacijski učinak tretmana vodenog, etanolnog i metanolnog ekstrakta pripremljenog iz odabranih biljnih vrsta roda *Tyhmus*, *Origanum* i *Teucrium* na genetički materijal normalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5) ispitan je u radu Oalđe i sur. (2020). Primjenjene su sljedeće koncentracije: 0,025, 0,05 te 0,1 mg mL⁻¹, a rezultati komet testa uspoređeni su s negativnom (voda, etanol ili metanol) i pozitivnom (H₂O₂) kontrolom. Prema rezultatima intenziteta repa za ekstrakte trave ive, uočeno je smanjenje udjela generiranih DNK fragmenata pri: 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$ za obje kontrole) za metanolni ekstrakt, 0,05 mg mL⁻¹ za etanolni ekstrakt ($p < 0,05$) za obje kontrole) te 0,05 mg mL⁻¹ za vodeni ekstrakt ($p < 0,05$ za obje kontrole). Dodatno, rezultati su pozitivno korelirani s određenim udjelima fenolnih kiselina i flavonoida, s dominantnom ružmarinskom kiselinom, odnosno luteolin-7-*O*-glukozidom. U novijoj studiji Tureyen i sur. (2023) detektirano je značajno povećanje intenziteta repa na

stanicama karcinoma jajnika (A2780) prilikom tretmana tubulozidom A, jednim od glavnih feniletanoidnih glikozida tradicionalne kineske biljke *Cistanche tubulosa*, i to pri koncentraciji od 100 μM ($p < 0,05$) u odnosu na standardni kemoterapeutik (100 μM 5-fluorouracil), uz potvrđenu indukciju apoptoze kancerogenih stanica aktivacijom transkripcijskog faktora p53 i kaskade reakcija enzima kaspaze za programiranu staničnu smrt.

U cilju proširenja baze podataka genotoksičnog, odnosno genoprotektivnog djelovanja, također je proveden tretman ekstraktom trave ive u istom rasponu koncentracija na modelnom plazmidu phiX174 RF1 DNA. Na temelju analizirane slike gela s vizualnim prikazima dobivenih vrpce relaksirajuće i superzavijene cirkularne forme plazmida, dobiveni su rezultati omjera superzavijene i relaksirajuće forme, pri čemu je genoprotektivni učinak proporcionalan s povećanju navedenog omjera.

S obzirom na pozitivnu i negativnu kontrolu, detektiran je statistički značajan ($p < 0,05$) genoprotektivni učinak najveće koncentracije ekstrakta trave ive (0,500 mg mL^{-1}) na modelni plazmid. Premda je izostala statistička značajnost koncentracije od 0,050 mg mL^{-1} u odnosu na pozitivnu kontrolu, vidljivo je da je omjer superzavijene i relaksirajuće forme povećan za 64 % u odnosu na tretman plazmida kombinacijom UV zračenja i H_2O_2 (PK), odnosno da je prooksidacijsko oštećenje znatno manje. Oalđe i sur. (2020) također su proučavali utjecaj vodenog, metanalnog i etanalnog ekstrakta trave ive na modelnom plazmidu pUC19 izoliranom iz *E. coli* pri koncentracijama od 0,1, 0,5 i 1 mg mL^{-1} , također primijenivši kombinirani tretman H_2O_2 i UV zračenja na superzavijenu DNK u cilju indukcije oštećenja. Najmanji udio oštećene, odnosno relaksirajuće forme određen je u vodenom ekstraktu ($< 5\%$) u odnosu na alkoholne (10-15 %), a značajno veće genoprotektivno djelovanje određeno je samo u odnosu na pozitivnu kontrolu, dok negativna nije niti analizirana. Genoprotektivni učinak na modelnom plazmidu moguće je djelomično povezati i s prisutnim feniletanoidnim glikozidima u ekstraktu. Premda nedovoljno istraženi u pogledu utjecaja na prevenciju i/ili usporavanje oksidacijskih procesa genetičkog materijala, dostupna istraživanja upućuju na njihov vrijedan antioksidacijski potencijal u inhibiciji DNK oštećenja. Tako su Jang i sur. (2020) utvrdili značajnu inhibiciju oksidacijskog oštećenja plazmida $\Phi\text{X-174 RF I DNK}$, induciranog Fe^{2+} ionima, odnosno hidroksilnim radikalima prilikom tretmana verbaskozidom izoliranim iz ekstrakta tradicionalne korejske biljne vrste *Abeliophyllum distichum* (Lamiaceae). Utvrđen je dozno ovisni učinak oba slučaja, sa smanjenjem oštećenja od 7,09 % pri 0,32 μM verbaskozida do 88,05 % pri 200 μM verbaskozida kod oštećenja induciranog dvovalentnim željezom, dok je kod tretmana hidroksilnim radikalima oštećenje smanjeno od 47,14 % pri 0,32 μM verbaskozida do 97,66 % pri 200 μM verbaskozida. U istom radu, u stanicama mišjih fibroblasta (NIH 3T3) potvrđen je

i utjecaj verbaskozida na inhibiciju fosforilacije transkripcijskih faktora p-53 i H2AX kao prvog indikatora DNK oštećenja. Zhang i sur. (2017) odredili su protektivni učinak ehinakozida na smanjenje fragmentacije DNK uzrokovane UVB zračenjem na stanicama keratinocita (HaCaT) i na *in vivo* modelu miša BALB/c. Odredili su značajnu redukciju udjela oksidiranog derivata gvanozina, kao biomarkera endogenog oštećenja DNK (8-OhdG), povećanjem koncentracije ehinakozida (25, 50 i 100 μM) za otprilike 20 % pri najvišoj koncentraciji u odnosu na kontrolu.

5.4. *In vivo* biološki učinci polifenolnog ekstrakta trave ive

5.4.1. Promjena mase štakora i pojedinih organa

Među brojnim fiziološkim parametrima koji se prate tijekom *in vivo* eksperimenta, poput dnevnog unosa vode i hrane, količine i izgleda urina i fecesa, procjene obrazaca ponašanja, poremećaja spavanja i dr., određivanje promjene mase štakora predstavlja jedan od važnih parametara za indikaciju i evaluaciju bioloških učinaka nekog spoja ili smjese spojeva (Gad, 2008). Utvrđeno je da tretman ekstraktom trave ive pri 250, 500 i 1000 mg kg^{-1} nije imao statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na promjenu mase štakora mužjaka i ženki u odnosu na kontrolu. Prosječna masa svih testiranih mužjaka i ženki na kraju eksperimenta iznosila je 372 g, odnosno 242 g, a što odgovara literaturnim podacima za normalnu tjelesnu masu štakora starosti od 12 tjedana za oba spola hranjenih hranom uravnoteženog nutritivnog sastava (Chadwick i sur., 2014). Piao i sur. (2013) dali su referentne vrijednosti mase štakora i organa za Sprague-Dawley zdrave štakore mužjaka i ženki u rasponu starosti od 13. do 104. tjedana. Relativna prosječna masa mužjaka nakon 13. tjedna iznosila je 408 g, dok je za ženke očekivano izmjerena značajna, otprilike dva puta manja prosječna masa (254 g), a što je u skladu s rezultatima ovog eksperimentalnog istraživanja. Dobiveni rezultati promjene mase štakora koreliraju s rezultatima izračunatih masenih udjela promatranih organa (jetra i bubrezi) koji su određeni u očekivanim i realnim vrijednostima za mužjake (jetra: 3,2-3,8 %, bubrezi: 0,70-0,71 %) i ženke (jetra: 3,2-3,8 %, bubrezi: 0,68-0,70 %), a što je u skladu s istraživanjem Piao i sur. (2013) čiji su rezultati za trinaest tjedana stare Sprague-Dawley zdrave štakore mužjaka (jetra: 2,45 %, bubrezi: 0,70 %) i ženki (jetra: 2,64 %, bubrezi: 0,75 %) bili u rangu dobivenih u ovom radu. Valencia-Avilés i sur. (2019) ispitivali su subakutnu oralnu toksičnost pročišćenog vodenog polifenolnog ekstrakta drveta hrasta (*Quercus crassifolia*) inače korištenog u industriji vina, ali i kao komercijalnog nutraceutika Oligopin®. Od ukupno 46 bioaktivnih komponenti iz skupine piranona, estera, ketona, amina i sl., detektiranih GC-MS analizom, od polifenola najzastupljeniji je bio tirosol. Korišteni su zdravi Wistar štakori mužjaka i ženki, starosti četiri

tjedna te hranjeni standardnom hranom *ad libitum*, a tretman prethodno otopljenim liofiliziranim ekstraktom (11, 33 i 100 mg kg⁻¹) izvršen je oralno-gastralnom kanilom kroz 28 dana. Tretman u cijelom rasponu koncentracija nije rezultirao statistički značajnim ($p > 0,05$) promjenama mase štakora niti promjene organa jetre, bubrega i ostalih ispitivanih organa. Ballesteros-Ramírez i sur. (2024) također nisu detektirali značajne promjene u masi štakora i organa prilikom ispitivanja akutne i kronične toksičnosti tretmana polifenolnim ekstraktom sjemenki tara gume (*Caesalpinia spinosa*), standardiziranog na udio hidrolizabilnih tanina (70-95%). Za ispitivanje akutne toksičnosti, u studiji su korištene samo zdrave Wistar ženke, starosti 8-12 tjedana, a tretirane su oralnom dozom od 2000 mg kg⁻¹ kroz 14 dana. Obzirom da ispitana koncentracija nije pokazala kliničke znakove akutne toksičnosti, pristupljeno je studiji kronične toksičnosti, a uz ženke, uvedeni su i Wistar mužjaci (oba spola starosti od sedam tjedana) te kunići iz roda *Oryctolagus* starosti 12 tjedana. Međutim, istraživanje Li i sur. (2020) na polifenolnom ekstraktu dobivenom valorizacijom otpadne kore iz tropskog voća rambutana, bogatog geraninom, katehinom, korilaginom, elaginskom kiselinom i oligomernim proantocijanidinima, ukazuje na drugačiji učinak tijekom subakutnog oralnog izlaganja (28 dana) Sprague-Dawley štakora pri koncentracijama od 312, 625, 1250 i 2500 mg kg⁻¹. Ustanovljeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje mase štakora oba spola, kao i smanjenje slezene te povećanje jetre pri 2500 mg kg⁻¹, a biokemijske i hematološke analize potvrdile su toksičnost koncentracija od 1250 i 2500 mg kg⁻¹ na jetru, bubrege i slezenu. Poznato je da na promjenu fizioloških i drugih ispitivanih čimbenika značajno utječe kemijska struktura spojeva, primijenjena koncentracija jednog ili smjese bioaktivnih spojeva, zdravstveno stanje životinja (normalno ili s prisutnim induciranim promjenama u svrhu ciljanog ispitivanja na neko oboljenje) te duljina izloženosti tretmanu.

5.4.2. Učinak na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora

U toksikološkim istraživanjima, biokemijske i hematološke vrijednosti koriste se za određivanje bioloških učinaka koji se ne mogu dokazati izravnim ispitivanjima organa i tkiva. Odstupanja od referentnih vrijednosti vrlo često su indikatori odstupanja od homeostaze metaboličkih procesa, odnosno različitih dijagnoza povezanih s poremećajima krvi, imunološkog sustava, metabolizma proteina, ugljikohidrata ili masti, funkcije jetre, bubrega i dr. Obzirom na rezultate izmjerenih jetrenih enzima, glukoze i metabolita regulacije volumena i sastava tjelesnih tekućina, u ovom radu ispitan je potencijalan utjecaj tretmana ekstraktom na funkcije jetre i bubrega te poremećaj metabolizma glukoze.

Aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT) najčešće su analizirani enzimi u utvrđivanju poremećaja rada jetre, a primarna funkcija im je kataliza transfera α – amino grupa aspartata i alanina u α -keto grupu metabolita α -ketoglutarne kiseline, kao esencijalnih metaboličkih reakcija za glukoneogenezu i tvorbu uree. AST enzim nalazi se u citoplazmi hepatocita (80 %) i mitohondrijima (20 %) sa širokom tkivnom distribucijom, dok je ALT enzim primarno prisutan u citoplazmi hepatocita. Ukoliko je prisutan poremećaj integriteta membrane hepatocita, ovi enzimi izlaze iz citoplazme pri čemu se povećava njihova koncentracija u krvi. Laktat dehidrogenaza (LDH) je citoplazmatski enzim sa širokom distribucijom među tkivima srca, skeletnih mišića i bubrezima, poput AST enzima. Postoji više različitih izozima (npr. LDH₅ dominira u jetri i značajno pridonosi LDH koncentraciji u serumu), a zbog niske specifičnosti se u biokemijskim nalazima uglavnom kvantificira kao ukupni LDH. Detektirane veće aktivnosti ovih enzima od referentnih vrijednosti upućuju na različite reverzibilne ili ireverzibilne promjene, poput hepatocelularne nekroze i upalnih stanja poput miozitisa, permeabilnosti hepatocitne membrane i dr. Za procjenu stanja jetre, vrlo često se analizira i ukupni bilirubin kao krajnji metabolit razgradnje hemoglobina u hepatocitima iz indirektnog, vodonetopivog bilirubina-I u direktni, vodotopivi bilirubin-II, a koji se u takvom obliku izlučuje sa žuči. Njegove povećane vrijednosti u krvi, indikator su ciroze jetre, virusnog hepatitisa, bilijarne opstrukcije i sl. Sagledavajući prethodno navedene biokemijske parametre dobivene u ovom radu, uočava se statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje AST enzima i kod mužjaka i kod ženki pri istoj koncentraciji (500 mg kg^{-1}), u odnosu na kontrolu. Dodatno, primijećeno je i statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) LDH enzima kod oba spola pri tretmanu od 500 mg kg^{-1} i 1000 mg kg^{-1} . Snižene razine ovih jetrenih enzima nisu od kliničkog značaja. Nadalje, vidljivo je da tretman ekstraktom trave ive nije statistički značajno utjecao ($p > 0,05$), ni na metabolizam glukoze ni na produkciju ukupnog bilirubina, neovisno o spolu, a što je također dobar indikator odsustva poremećaja jetrenih funkcija. Kod procjene poremećaja bubrežnih funkcija, u obzir su uzeti kreatinin i urea, kao dva krajnja metabolita metabolizma proteina s putem izlučivanja iz organizma preko mokraće. Uz navedeno, kreatinin je najčešće korišteni endogeni biomarker bubrežne glomerularne funkcije, stvara se u procesu mišićnog metabolizma, a osjetljiviji je parametar u odnosu na ureu. Urea je završni produkt deaminacije aminokiseline u ciklusu uree, a obzirom da nastaje u jetri dok se 85 % ukupno stvorene uree eliminira putem mokraće, povišene vrijednosti izravno su povezane s poremećajima funkcije jetre i bubrezima. Prema dobivenim rezultatima, zaključuje se da tretman ekstraktom u cijelom rasponu koncentracije nije uzrokovao negativan učinak na bubrežne funkcije, obzirom da su vrijednosti bile, ili nepromijenjene ili statistički značajno manje kod oba spola ($p < 0,05$).

U sklopu analize krvnih stanica, odnosno detekcije aktivnih upalnih procesa, određuju se hematološki parametri: broj leukocita, eritrocita i trombocita, koncentracija hemoglobina, volumnog udjela eritrocita-hematokrita te ostali izvedeni parametri poput MCV-a, MCH-a, MCHC-a, RDW-a, kao indikatora dodatne karakterizacije, odnosno kvalitete eritrocita i MPV-za morfološku karakterizaciju trombocita. Obzirom na dobivene rezultate u ovom radu, može se zaključiti da tretman ekstraktom trave ive nije uzrokovao statistički značajno ni povećanje ni smanjenje broja leukocita, eritrocita niti trombocita, a čije povećanje znači prisutnost infekcije ili poremećaja zgrušavanja krvi. Svi ostali promatrani parametri također nisu statistički značajno različiti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$), osim statistički značajnog ($p < 0,05$) sniženja koncentracije hemoglobina i snižene raspodjele eritrocita po volumenu krvi (RDW) kod ženki tretiranih najvećom koncentracijom ekstrakta, u odnosu na kontrolu.

Uzimajući u obzir analizirane vrijednosti za sve navedene biokemijske i hematološke parametre krvi štakora nakon tretmana ekstraktom trave ive, može se uočiti odsutnost upalnih procesa i poremećaja metaboličkih funkcija. Nadalje, dobivene vrijednosti su u skladu s referentnim vrijednostima određenima na Sprague-Dawley soju štakora mužjaka i ženki (He i sur., 2017). Promjene u biokemijskim i hematološkim parametrima također nisu zabilježene u istraživanju Ballesteros-Ramírez i sur. (2024) prilikom tretmana polifenolnim ekstraktom sjemenki tara gume bogatih hidrolizabilnim taninima. S druge strane, dozno ovisan utjecaj potvrđen je u radu Valencia-Avilés i sur. (2019) s polifenolnim ekstraktom bogatim tirosolom, obzirom da je tretman najvećom primijenjenom koncentracijom (100 mg kg^{-1}) rezultirao povećanjem kreatinina, ali i nekih hematoloških parametara poput hemoglobina, HMC, MHCH i RDW vrijednosti, kao indikatora mogućih imunomodulatornih svojstava ispitivanog ekstrakta, ili pojave anemije uslijed smanjenja asimilacije željeza.

5.4.3. Učinak na markere oksidacijskog stresa jetre i bubrega

Prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala uslijed pojačane aktivnosti endogenih i egzogenih izvora u konačnici dovodi do kumulativnih strukturnih alteracija i oksidacijskih oštećenja staničnih makromolekula, odnosno generiranja reaktivnih karbonilnih grupa koji reagiraju s nukleofilnim grupama proteina. **Karbonilacija proteina** definira se kao ireverzibilna, post-translacijska modifikacija koja, putem konformacijskih promjena u polipeptidnim lancima, uzrokuje promjenu njegove funkcije, i posljedično, niz različitih upalnih reakcija koje završavaju citotoksičnim i apoptoznim procesima (Akagawa i sur., 2006). Tako mogu nastati karbonili visoke ili niske molekulske mase, ovisno da li se oksidacijom

formiraju aldehidne, keto ili laktam grupe u makromolekulama proteina i lipida, ili nastaju oksidacijski derivati kao produkti reakcija glikooksidacije proteina i lipidne peroksidacije. Glavni mehanizmi karbonilacije proteina su: i) oksidacija aminokiselinskih ogranaka pomoću reaktivnih kisikovih radikala uslijed metal-katalizirane oksidacije, odnosno Fenton reakcije, ii) oksidacija pomoću aldehidnih produkata deriviranih iz lipidne peroksidacije, iii) glikacija proteina uslijed reakcije amino grupa proteina i karbonilnih grupa reducirajućih šećera pri čemu nastaju stabilni adukti, tj. napredni krajnji produkti glikacije (eng. *advanced glycation end products*), iv) enzimatska karbonilacija pomoću lizil oksidaze te v) oksidacija polifenolnim derivatom kinonom (Fedorova i sur., 2013). Najzastupljeniji karbonilirani produkti uslijed vezanja hidroksil radikala su α -aminoadipinski semialdehid kao derivat lizina (AAS) i γ -glutaminski semialdehid (GGS) kao derivat arginina i prolina, čineći oko 60 % ukupno generiranih karboniliranih proteina (Akagawa i sur., 2006).

Rezultati određivanja ukupnih karboniliranih proteina, kao važnog biomarkera pojačanog oksidacijskog stresa, upućuju na poželjno, odnosno statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) njihove tvorbe u jetri pri tretmanu ekstraktom trave ive od 500 i 1000 mg kg⁻¹, neovisno o spolu, a kod ženki je primijećen pozitivan učinak i pri najnižoj koncentraciji. Xiong i sur. (2016) tako su proučavali protektivni učinak ekstrakta cvijeta (350 i 700 mg kg⁻¹) *Osmanthus fragrans*, bogatog verbaskozidom, salidrozidom, ehinakoziidom i izoakteozidom, na *in vivo* D-galaktozom induciranom modelu starenja, usporedno s tretmanom verbaskozidom (100 i 200 mg kg⁻¹) kao najdominantnijim spojem (28 % udjela na biljni materijal). Konkretno, promatran je učinak na formiranje naprednih krajnjih produkata glikacije koji inače ne-enzimatski reagiraju s proteinima, lipidima i DNK uzrokujući oksidacijska oštećenja vezana za ubrzano starenje. Tretman najvećom dozom ekstrakta i verbaskozida usporedno s pozitivnom kontrolom rezultirao je inhibicijom produkcije karboniliranih produkata. Nadalje, u radu Han i sur. (2023) istraživan je i učinak ehinakozida (10 mg kg⁻¹) u formi nanokompleksa s hijaluronskom kiselinom/poli(etileniminom) i cinkom, kao potencijalnim inhibitorom glikacijskih procesa kože na *in vivo* D-galaktozom induciranom modelu miša. Ustanovljen je značajan antiglikacijski učinak kroz inhibiciju funkcije kompleksa MDM2/STAT2 (regulatora tumorskog supresora, i transduktora signala i aktivatora transkripcije) na supresiju imunoglobulinskog receptora RAGE, a koji inače potiče produkciju naprednih krajnjih produkata glikacije. S druge strane, na bubrezima nije utvrđen statistički značajan ($p > 0,05$) učinak ekstrakta trave ive kod mužjaka, dok je kod ženki uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje generiranja ukupnih karboniliranih proteina samo pri 250 mg kg⁻¹. Jedno od mogućih objašnjenja može biti selektivan utjecaj metabolita feniletanoidnih glikozida, poput kafeinske

kiseline, a koja može imati prooksidacijsko djelovanje uslijed autooksidacije i pretvorbe u semikinone i kinone pri određenom pH, koncentraciji i prisutnosti metalnih iona (Eghbaliferiz i Iranshahi, 2016).

Uz prethodno spomenute mehanizme karbonilacije biomolekula s naglaskom na proteine, **lipidna peroksidacija** predstavlja jedan od najučestalijih biokemijskih procesa za proizvodnju staničnih medijatora u prisutnosti kisikovih radikala, a koji pospješuju razvoj upalnih procesa, neurodegenerativnih bolesti, karcinoma, ferroptoze kao programirane stanične smrti ovisne o željezu i prisutnosti lipidnih peroksida i sl. (Gaschler i Stockwell, 2017). Generiranje lipidnih peroksida, tj. endoperoksida i hidroperoksida, mijenja strukturu i funkciju staničnih membrana, a obzirom da su to visoko reaktivne vrste, iste sudjeluju u reakcijama propagacije drugih vrsta reaktivnih kisikovih radikala, ili se degradiraju u produkte sposobne za unakrsno povezivanje s DNK i proteinskim strukturama. Lipidni peroksidi nastaju neenzimatskom ili enzimatskom peroksidacijom, ovisno da li su uključeni ugljikovi i kisikovi radikali u oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina kroz Fentonovu reakciju, ili aktivacijom lipooksigenaza. U lipidnoj peroksidaciji, najčešći supstrat je neka polinezasićena masna kiselina iz koje se, u prisutnosti redoks aktivnog metala ili radikala, generira rezonantno stabilni ugljikov radikal prilikom uklanjanja protona. Daljnjom izomeracijom, formira se vrlo stabilan konjugirani dien koji dalje reagira s kisikom (Gaschler i Stockwell, 2017). Uz kiseline, aldehidi su vrlo česti degradacijski produkti lipidnih peroksida, među kojima su najistraživaniji 4-hidroksinonenal i malondialdehid (Ayla i sur., 2014). Malondialdehid je visokoreaktivni dialdehid koji reagira s primarnim aminima na proteinima, nukleinskim kiselinama i primarnim aminima stvarajući 1,4-dihidropiridin, pri čemu nastale kovalentne modifikacije mijenjaju funkciju ovih biomolekula, uzrokujući tako patološke procese (Gürbüz i Heinonen, 2015).

Prema rezultatima izmjerenog malondialdehida na stanicama tkiva jetre, vidljivo je da ne postoji statistički značajan ($p > 0,05$) utjecaj tretmana ekstraktom trave ive, neovisno o spolu. Međutim, kod stanica bubrega vidi se statistički značajan ($p < 0,05$) učinak povećanja malondialdehida kod ženki, a pri istoj koncentraciji koja je uzrokovala porast karboniliranih proteina kod istog spola. Uzimajući u obzir usku povezanost generiranih karboniliranih proteina koji se, uz sve ostale mehanizme, oksidiraju i pomoću aldehida nastalih lipidnom peroksidacijom, ova korelacija je djelomično i očekivana. U radu Shi i sur. (2013) utvrđena je protektivna uloga feniletanoidnih glikozida (verbaskozida, izoverbaskozida, savatizida A i E) iz ekstrakta *Monochasma savatieri* (45, 90 i 180 mg kg⁻¹) na *in vivo* induciranom modelu miokardinalne ishemije, a u vidu inhibicije produkcije malondialdehida u odnosu na kontrolu. U svrhu ispitivanja hepatoprotektivnog učinka ekstrakta *Acanthus ilicifolius* (300, 150, 75 mg

kg⁻¹), kao izvora verbaskozida, izoverbaskozida i izokrenatozida, Zhang i sur. (2020) inducirali su jetreno oboljenje na modelu miša pomoću ugljikovog tetraklorida. Među mnogim parametrima oksidacijskog stresa, mjeren je i udio malondialdehida, a ustanovljeno je statistički značajno smanjenje njegove tvorbe pri svim testiranim koncentracijama. Snažno hepatoprotektivno djelovanje ekstrakta *Plantago major* pri koncentraciji od 500 mg kg⁻¹ također je utvrđeno na induciranom oboljenju ugljikovim tetrakloridom kod Wistar štakora (Eldesoky i sur., 2018). Unosom ugljikovog tetraklorida (CCl₄), u endoplazmatskom retikulumu inducirana je tvorba njegovog visoko reaktivnog radikala (CCl₄•), a čime je, u prisustvu kisika, potaknuta lipidna oksidacija. Osim značajnog smanjenja koncentracije jetrenih enzima u odnosu na pozitivnu kontrolu, pozitivan učinak ekstrakta u inhibiciji lipidne peroksidacije uspoređen je s učinkom silimarina kao konvencionalnog lijeka za liječenje jetrenih oboljenja, smanjivši tako udio malondialdehida za 46 %. Navedeni primjeri, ali i rezultati ove studije obzirom na ispitane stanice jetre, upućuju da ekstrakti bogati feniletanoidnim glikozidima mogu eksprimirati hepatoprotektivan učinak kroz učinkovitu neutralizaciju reaktivnih kisikovih radikala i sprječavanje njihovog povećanja, ili eksprimiranje protuupalnog učinka mimo antioksidacijskog, aktivirajući specifične signalne puteve koji inhibiraju reakcije lipidne peroksidacije.

Ključnu ulogu u održavanju stanične redoks homeostaze imaju različiti endogeni antioksidacijski enzimi, poput superoksid dismutaze, katalaze i glutacion peroksidaze, ali i neenzimski antioksidansi od kojih je najpoznatiji **glutacion**. U reduciranoj formi (GSH), ovaj tripeptid glutaminske kiseline, cisteina i glicina ima visokopotentno svojstvo stabilizacije reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala. Naime, u prisustvu elektrofila kao što su radikali, GSH prima njihove nesparene elektrone i istovremeno se uslijed visokog afiniteta prema tiolnim skupinama oksidira u svoj dimer tvoreći disulfidnu vezu (GSSH). Nakon stabilizacije radikala, GSSH se redukcijom pomoću glutacion reduktaze i kofaktora NADPH vraća u svoj reducirani, aktivni oblik (Couto i sur., 2016). Prilikom relativne stanične homeostaze, udio aktivnog oblika glutaciona naspram oksidiranog oblika u citoplazmi je u omjeru 30:1 do 100:1 (Bass i sur., 2004). Ukoliko nastupe prooksidacijski uvjeti, aktivira se glutacion sustav, a što rezultira dodatnom aktivacijom enzima glutacion reduktaze, i posljedično, generiranjem većih količina aktivnog, reduciranog oblika glutaciona, a sve u cilju zaštite biomolekula od oksidacijskih procesa. Drugi glutacion-ovisni enzimatski sustavi također dodatno jačaju stanični endogeni antioksidacijski kapacitet, poput glutacion peroksidaze koja GSH koristi kao kofaktor u redukciji vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida, ili glutacion transferaze koja

aktivira fazu detoksikacije i uklanjanja ksenobiotika i njihovih toksičnih metabolita uz GSH kao kofaktor (Heverly-Coulson i Boyd, 2010; Board i Menon, 2013).

Rezultati izmjerenog ukupnog GSH (reducirani+oksidirani oblik), upućuju na statistički značajan ($p < 0,05$) zaštitni učinak ekstrakta trave ive na stanice jetre ženki pri koncentraciji od 250 mg kg^{-1} , dok je kod mužjaka ustanovljena statistički značajna ($p < 0,05$) povećana količina izmjerenog ukupnog glutaciona pri tretmanu od 500 mg kg^{-1} , a što upućuje na poremećaj stanične ravnoteže, odnosno prekomjernu aktivaciju enzima glutation reduktaze u regeneraciji aktivnog, GSH oblika, uslijed njegovog prekomjernog trošenja za stabilizaciju prisutnih radikala. Na stanicama bubrega kod mužjaka, također je određena statistički značajno povećana aktivnost ukupnog glutaciona ($p < 0,05$) pri 250 i 500 mg kg^{-1} , a što je indikator prekomjernog akumuliranja reaktivnih radikala u stanici.

Mnoge provedene studije na ekstraktima bogatima derivatima hidroksicimetnih kiselina baš poput istraživane trave ive, potvrdile su njihove hepatoprotektivne (Eldesoky i sur., 2018), kardioprotektivne (Shi i sur., 2013; Sun i sur., 2020) te „anti-aging” učinke (Xiong i sur., 2016), u vidu efektivnog uklanjanja reaktivnih vrsta i značajne redukcije izazvanog oksidacijskog stresa, a obzirom na detekciju značajnog smanjenja trošenja, odnosno generiranja aktivnog oblika GSH. Uzimajući u obzir snažnu nukleofilnost uslijed prisutnosti tiolne skupine te fleksibilnost konjugiranja s reaktivnim vrstama različitih kemijskih struktura, GSH je visoko učinkoviti antioksidans za stabilizaciju citotoksičnih metabolita (Dringen i sur., 2015).

5.4.4. Učinak na parametre genotoksičnosti u krvi te jetri i bubrezima

Doživotna izloženost različitim egzogenim čimbenicima, poput UV zračenja, pesticida, teškim metalima i dr., oksidacijskom stresu te kompenzacijski mehanizmi za održavanje homeostaze organizma u konačnici rezultiraju nakupljanjem oštećenja genetičkog materijala, uzrokujući starenje, a vrlo često i različita oboljenja poput karcinoma. Genotoksični spojevi mijenjaju DNK strukturu i informaciju koju ona nosi, ili uzrokuju njenu fragmentaciju. Uz DNK reaktivne spojeve koji direktnim oštećenjem uzrokuju stvaranje kovalentnih DNK aduktora i unakrsnih veza unutar ili između DNK lanaca, postoji i druga kategorija genotoksičnih supstanci koje indirektnim mehanizmima uzrokuju DNK oštećenja, poput visokoreaktivnih kisikovih radikala (ROS) i drugih reaktivnih metabolita kao produkata metabolizma masti, proteina i ugljikohidrata, a koji ometaju metaboličke procese popravka oštećenja genoma i očuvanja integriteta kromosoma (WHO i FAO, 2020). Uz endogene (enzimske i ne-enzimske) antioksidacijske sustave, oksidacijski stres kao rezultat narušene

stanične homeostaze uslijed proizvodnje ROS-ova u suvišku, može se efektivno umanjiti unosom egzogenih antioksidansa koji učinkovito podupiru intracelularne sustave u neutralizaciji slobodnih radikala (Soobrattee i sur., 2005).

Obzirom na prethodno ustanovljena antioksidacijska svojstva polifenolnog ekstrakta trave ive, u ovom radu ispitan je mogući utjecaj polifenolnog ekstrakta trave ive na smanjenje oksidacije genetičkog materijala primjenom komet testa. Ova metoda omogućuje brzu i relativno osjetljivu detekciju oštećenja DNK na razini stanice u vidu jednolančanih i/ili dvolančanih lomova, unakrsnog povezivanja lanaca te oštećenja baza u DNK molekuli. Pokazatelji DNK oštećenja su: i) dužina komet repa koja predstavlja udaljenost na koju su fragmenti DNK otputovali iz jezgre te je proporcionalna dužini odlomljenih fragmenata, ii) postotak DNK u repu ili intenzitet repa koji predstavlja udio, tj. količinu oštećenih DNK fragmenata te iii) te repni moment kao relativni omjer dužine postotka DNK u repu (Collins, 2004). Utvrđeno je statistički značajno ($p < 0,05$) genoprotektivno djelovanje na stanice krvi pri 500 i 1000 mg kg⁻¹ kod oba spola, a kod ženki i pri 250 mg kg⁻¹. Na stanicama jetre i bubrega, utvrđeno je statistički značajno ($p < 0,05$) genoprotektivno djelovanje obzirom na rezultate intenziteta repa, kao indikatora količine nastalih DNK oštećenja, pri tretmanu od 500 i 1000 mg kg⁻¹ kod oba spola. Za neke feniletanoidne glikozide, poput verbaskozida i ehinakozida, dokazani su različiti indirektno eksprimirani zaštitni učinci na stanicu kroz, primjerice, UV-A te UV-B fotoprotektivno djelovanje što značajno reducira produkciju ROS-ova (Acevedo i sur., 2005), antioksidacijsko djelovanje u vidu popravka membrane eritrocita pri induciranom oksidacijskom stresu na modelu kunića (Liu i sur., 2003) ili sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala (Trampetti i sur., 2019; Ding i sur., 2023). Nadalje, utvrđeno je i snažno protuupalno djelovanje kao posljedica sposobnosti verbaskozida u supresiji upalnih medijatora i transkripcijskog faktora NF- κ B ključnog za regulaciju imunološkog odgovora i odgovora na stanični stres, tako povećavajući aktivnost endogenih antioksidacijskih enzima (Jing i sur., 2015). Poznato je da feniletanoidni spojevi iniciraju aktivnost različitih enzimskih sustava, poput CYP1 enzima unutar enzimskog sustava citokroma P450 i enzima Faze 2 neophodnih za aktivaciju staničnog odgovora na stres. Nadalje, ovi enzimi vezanjem za AhR transkripcijski faktor sudjeluju u regulaciji faktora rasta, citokina, MAPK protein-kinaza, ključnih za stanični oporavak i diferencijaciju (Korkina i sur., 2011). Od biljnih ekstrakata bogatih feniletanoidnim glikozidima, ispitan je genotoksični učinak na komercijalnom pripravku Memoregain®, dobiven iz biljke *Cistanche tubulosa*. *In vivo* eksperiment proveden je na ICR miševima mužjaka starim šest tjedana, pri koncentracijama pripravka od 0,15, 0,3 i 0,5 g kg⁻¹ u ovisnosti od 24, 48 i 72 sata izloženosti. Provedbom mikronukleus testa, nije ustanovljena statistički

značajna razlika u odnosu na kontrolu u frekvenciji mikronukleiranih polikromatskih eritrocita, a koji su pokazatelji inducirano gromosomskog oštećenja (Liao i sur., 2018).

Uzimajući u obzir rezultate dužine repa kod jetre mužjaka, uočeno je pak suprotno djelovanje, odnosno statistički značajno povećanje veličine oštećenja ($p < 0,05$) pri istim koncentracijama ekstrakta trave ive na kojem je uočeno statistički značajno smanjenje intenziteta repa. Moguće objašnjenje za primijećeni dualni učinak ekstrakta trave ive leži u metaboličkoj transformaciji feniletanoidnih glikozida djelovanjem različitih enzima u organizmu (Kostyuk i sur., 2008). Premda nije analizirano u ovom radu, druga istraživanja upućuju na nastanak derivata kafeinske kiseline i hidroksitirosole prilikom hidrolize feniletanoidnih glikozida, od kojih kafeinska kiselina, prema IARC-u, spada u grupu 2B kao „mogući kancerogen“ (IARC, 1993). Premda su za kafeinsku kiselinu utvrđena protuupalna svojstva, primjerice, njenim djelovanjem na transkripcijski faktor NF- κ B, a koji smanjuje ekspresiju gena COX-2, iNOS i 5-LO uključenih u upalne procese, dokazana je i oksidacija kafeinske kiseline putem toksičnog puta NADPH/CYP450E1, a čiji metabolit rezultira konjugacijom sa glutationom ili formacijom *O*-kinona koji onda mogu formirati hidroksilirane adukte s molekulama poput DNK (Lee i sur., 2008; Moridani i sur., 2002) Tako, primjerice u radu Santos Cruz i sur. (2012), nije potvrđen genotoksični učinak verbaskozida (27, 57, 81, 135 i 173 mM) na modelu vinske mušice nakon 48 sata izlaganja (u ovom kontekstu kroničan učinak), dok je toksičan učinak na DNK materijal, ispitan komet testom, primijećen pri najvišoj dozi kafeinske kiseline (173 mM). S druge strane, Bhalli i sur. (2019) ispitivali su genotoksičnost kafeinske kiseline mononukleus testom (izlaganje kroz 96 sata) i komet testom (izlaganje kroz 24 i 45 sati) na stanicama krvi i jetre Sprague-Dawley mužjaka pri koncentracijama od 500, 1000 i 2000 mg kg⁻¹. Rezultati intenziteta repa nisu rezultirali značajnim DNK oštećenjima na ispitivanim stanicama i pri dozno ovisnom tretmanu, dok je mikronukleus test ukazao na genotoksični učinak najviše primijenjene koncentracije na stanicama krvi. Nadalje, brojne studije ističu rezultate intenziteta repa kao najmjerodavnije za procjenu genotoksičnosti komet testom. Razlog leži u činjenici da dužina repa raste samo prilikom njegovog nastanka, odnosno kada su oštećenja relativno mala. Ukoliko su prisutna veća oštećenja, rast će samo intenzitet repa, ali ne i njegova dužina. Dodatni razlog je visoka osjetljivost dužine repa na postavke pragova detekcije u softver programu za vizualizaciju i obradu sliku, što može u konačnici dati lažne rezultate. Smatra se da parametar intenziteta repa daje realniji uvid u sliku, obzirom da je linearno povezan s udjelom fragmenata oštećene DNK u repu (Collins, 2004).

5.5. Inkapsulacija ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjem

5.5.1. Reološka karakterizacija otopina nosača

Uzimajući u obzir značajan utjecaj reoloških svojstava polimernih otopina na uspješnost atomizacije i formiranje veličine kapljica, iskorištenje sušenja raspršivanjem i morfološke karakteristike inkapsulata, tj. veličinu i homogenost čestica (Filkova i sur., 2006; Sarrate i sur., 2015), provedeno je određivanje krivulja viskoznosti i linearnog viskoelastičnog područja za sve korištene sustave nosača na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze.

Utvrđeno je da uzorak AG pokazuje Newtonovsko ponašanje u primijenjenom području brzine smicanja obzirom na visoko razgranatu strukturu i steričke smetnje uslijed prisutnosti galaktoznih i drugih šećernih bočnih jedinica vezanih za glavni galaktopiranozni lanac, a što onemogućuje formiranje interakcija između polimernih lanaca kao u slučaju linearnih struktura polimera (Li i sur., 2019). Newtonovsko ponašanje utvrđeno je i za uzorak GG, a što je posljedica reduciranog stupnja polimerizacije (omjer molekulske mase polimera i molekulske mase jedinice monomera) uslijed enzimatske hidrolize lanca galaktomanana (Mudgil i sur., 2018). Supstitucijom arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume sa 25 % karagenana i karboksimetil celuloze na ukupnu masu polimera, vidljiva je promjena u vidu prijelaza iz Newtonovskog u pseudoplastično ponašanje, kao i statistički značajno povećanje prividne viskoznosti otopina ($p < 0,05$). Pseudoplastično ponašanje posljedica je anizotropnih svojstava polimera tj. kidanja intermolekularnih veza između umreženih polimernih lanaca duž primijenjene povećane sile smicanja (Li i sur., 2009; Dong i sur., 2021), do postizanja konstantne vrijednosti viskoznosti. Nadalje, vidljiv je prijelaz iz dominantno viskoznog ponašanja arapske gume u elastično ponašanje supstitucijom četvrtine udjela kappa-karagenanom ($\tan \delta_{LVE} < 1$). Ovaj polimer galaktoze pokazuje elastični karakter i gelirajuća svojstva uslijed prisutnosti sulfatnih grupa i 3,6-anhidro-D-galaktoze sposobnih za interakcije s drugim kationskim polimerima (van de Velde, 2008). Premda je uvođenje karboksimetil celuloze rezultiralo statistički značajnim povećanjem viskoznosti ($p < 0,01$), AG_KMC polimerni sustav zadržao je više viskozan nego elastičan karakter. Kod uzorka GG, uvođenje karboksimetil celuloze i karagenana nije rezultiralo povećanjem elastičnog karaktera binarnih polimernih otopina, a što je vjerojatno posljedica niskog stupnja polimerizacije. Bak i sur. (2018) utvrdili su pozitivan učinak karboksimetil celuloze u povećanju interakcija između polisaharidnih lanaca i elastičnosti binarnog sustava guar gume i ksantana. Nadalje,

pseudoplastično ponašanje uzorka KMC već je utvrđeno u dosadašnjim istraživanjima (Dong i sur., 2021; Bak i sur., 2018). Najmanji iznosi prividne viskoznosti kod binarnih sustava KMC_AG i KMC_GG rezultat su hidrolitičkog tretmana korištene arapske i djelomično hidrolizirane guar gume, kao i slične polielektrolitne prirode korištenih polimera koje mogu rezultirati steričkim zasjenjivanjem naboja i/ili nemogućnošću stvaranja nekovalentnih veza uslijed prisutnosti skupina istog naboja. Visoka prividna viskoznost uzorka KMC posljedica je velikog hidrodinamičkog volumena karboksimetil celuloze kao posljedice visoke molekularne mase, povoljne interakcije s vodom i linearno povezanih polimernih lanaca koji osiguravaju relativno jake kohezijske sile između molekula pri puno nižim koncentracijama (Rushing i Hester, 2003; Williams i Phillips, 2009; Wyatt i Gunther, 2011). Poznato je da molekularna masa i koncentracija polimera te priroda interakcija između polisaharida i/ili proteina utječu na konačnu viskoznost (Bai i sur., 2017). Obzirom na dobivene rezultate testa amplitude i izmjerenog linearnog viskoelastičnog područja, svi polimerni sustavi na bazi karboksimetil celuloze pokazali su sličnu, viskoznu strukturu, a što korelira i s manjim udjelima elastične komponente u odnosu na viskoznu ($\tan \delta$ između 1,75 i 3,27) kao indikatorom stupnja intermolekularnih interakcija. Sušenje raspršivanjem pokazalo se uspješnim na polimernim otopinama različitih karaktera, uključujući Newtonovske, pseudoplastične i Bogerove fluide (Newtonovski fluidi s elastičnim karakterom) (Porfirio i sur., 2021), a što je utvrđeno i u ovom istraživanju.

5.5.2. Fizikalna karakterizacija inkapsulata

U kontekstu potencijalnog prijenosa proizvodnje na veće mjerilo, *iskorištenje tehnike* sušenja raspršivanjem smatra se vrlo važnim parametrom. Kod uzoraka na bazi arapske gume, prinos tehnike se statistički značajno smanjio dva puta uvođenjem karagenana (AG_KAR) i karboksimetil celuloze (AG_KMC), u odnosu na uzorak AG ($p < 0,05$). Ovakav rezultat može se povezati s prevelikom prividnom viskoznošću polimernih sustava AG_KAR i AG_KMC koja je onemogućila prikladno raspršenje kapljica, a time i efikasan transfer topline i mase, rezultirajući velikim gubicima polimerne otopine na stijenkama komore za raspršivanje. Sve mikročestice na bazi arapske gume rezultirale su visokim udjelima suhe tvari (93-98%). Kod uzoraka na bazi djelomično hidrolizirane guar gume, vidljivo je statistički značajno smanjenje iskorištenja tehnike uvođenjem hidroliziranog kolagena (GG_KOL) i karboksimetil celuloze (GG_KMC) ($p < 0,05$), a što je suprotno trendu kod polimernih sustava na bazi arapske gume. Uzorak GG rezultirao je mikročesticama najmanjeg udjela vode, dok je uvođenje hidroliziranog

kolagena (GG_KOL) i karboksimetil celuloze (GG_KMC) utjecalo na smanjenje efikasnosti transfera topline i mase tijekom procesa sušenja raspršivanjem, obzirom na dobivene rezultate suhe tvari ispod 90 %. Gubici proizvoda povezani su i s nakupljanjem mikročestica na ulaznom i izlaznom dijelu ciklona, filteru za pročišćavanje zraka te pojavom ljepljivosti, a koja uzrokuje taloženje polimernog materijala na stijenci komore za raspršivanje (Boonyai i sur., 2004). Martinić i sur. (2022) odredili su znatno veće iskorištenje tehnike za 4%-tne otopine arapske gume (86,82 %) i 4%-tne guar gume (68,80 %) u polifenolnom ekstraktu maslačka, dok su udjeli suhe tvari bili usporedivi s rezultatima u ovom radu (GG: 92,00 %, AG: 94,75 %). Vargas-Muñoz i sur. (2020) utvrdili su iskorištenje tehnike od 52 % korištenjem sustava nosača hidroliziranog kolagena i maltodekstrina (6:1) za inkapsulaciju koncentrata pulpe cocona voća, uz dobivanje visokostabilnog inkapsulata (98,75 %). Kod polimernih sustava na bazi karboksimetil celuloze, statistički značajno povećanje iskorištenja tehnike ($p < 0,05$) uslijed uvođenja arapske gume (KMC_AG), djelomično hidrolizirane guar gume (KMC_GG), hidroliziranog kolagena (KMC_KOL) i karagenana (KMC_KAR) djelomično se može objasniti i smanjenjem prividne viskoznosti koja je omogućila formiranje kapljica prikladnih veličina tijekom atomizacije, a time i povoljan transfer topline i mase između otopine i zagrijanog zraka za formiranje mikročestica s vrlo niskim udjelom vode (95-97 %). Osim reoloških svojstava, na iskorištenje tehnike utječu i intrinzična svojstva polimera, odnosno temperatura staklastog prijelaza, radni uvjeti procesa s naglaskom na protok medija za raspršivanje, otvor mlaznice, protok otopine, ulaznu temperaturu i sl. (Ross, 2008; Jaya i Das, 2008; Woo i sur., 2010). Castro-López i sur. (2021) također su dobili značajno veći prinos mikročestica obogaćenih polifenolnim ekstraktom *Moringe oleifera* iz binarnih polimernih sustava na bazi karboksimetil celuloze s tragakant i lokust gumom (57-68 %), u odnosu na samostalno korištenu karboksimetil celulozu (56 %). Remígio i sur. (2024) odredili su veće iskorištenje tehnike (77,40 %) primjenom Na-karboksimetil celuloze (0,9 %) za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta listova tropske biljke *Bauhinia unguolata*, rezultirajući stabilnim inkapsulatima s udjelom suhe tvari od 96,75 %.

Prema dobivenim rezultatima *zeta potencijala*, može se uočiti statistički značajan utjecaj uvođenja sekundarnih polimernih nosača na povećanje ili smanjenje elektrostatskih repulzija ($p < 0,05$). Uvođenje karagenana (AG_KAR) rezultiralo je poboljšanom stabilizacijom inkapsulata u ispitivanom otapalu u odnosu na samostalno korištenu arapsku gumu, a što je posljedica uvođenja ionizirajućih sulfatnih grupa. Rigolon i sur. (2024) odredili su značajno veći zeta potencijal (-21 mV) za inkapsulat ekstrakta antocijana iz acai voća na bazi arapske gume u vodi, a što su povezali s prisutnošću ionizirajuće strukture D-glukuronske kiseline.

Uvođenje karagenana (GG_KAR) i karboksimetil celuloze (GG_KMC) u otopinu djelomično hidrolizirane guar gume kao baznog nosača, također je povećalo negativne naboje na površini mikročestica, a što se može pripisati negativnim sulfatnim skupinama iz karagenana te ioniziranim karboksilnim skupinama karboksimetil celuloze. S druge strane, uvođenje hidroliziranog kolagena (GG_KOL) dovelo je do neutralizacije površinskog naboja mikročestica i destabilizacije inkapsulata u metanolnoj otopini, s većim potencijalom njihove naknadne aglomeracije. Negativne vrijednosti zeta potencijala svih KMC inkapsulata (od -17,91 do -11,76 mV) rezultat su deprotoniranih karboksilnih skupina glavnog polimernog nosača. Uvođenje arapske gume (KMC_AG) rezultiralo je dodatnim, statistički značajnim smanjenjem zeta potencijala odnosno povećanjem elektrostatskog odbijanja (-17,91 mV), u odnosu na samostalnu KMC polimernu otopinu (-15,59 mV) ($p < 0,05$), a što je moguća posljedica prisutnosti deprotoniranih hidroksilnih i karboksilnih skupina kod arapske gume. Dodatak djelomično hidrolizirane guar gume u otopinu nosača na bazi karboksimetil celuloze (KMC_GG) uzrokovao je statistički značajno smanjenje elektrostatskih repulzija u otopini ($p < 0,05$), vjerojatno zbog prisutnosti nenabijenih grupa djelomično hidrolizirane guar gume. Promatrani rezultati ukazuju na relativno nisku stabilnost u vodenim sustavima. Ovi rezultati povezani su s visokim vrijednostima indeksa polidisperzije (PI) za gotovo sve analizirane AG, GG i KMC inkapsulate (0,67-1,00), što ukazuje na visoku heterogenost veličine čestica unutar svakog uzorka, odnosno visok potencijal za aglomeraciju mikročestica (Souza i sur., 2012).

Rezultati mjerenja *kontaktnog kuta* (θ °) korišteni su za kvalitativnu procjenu močivosti odnosno hidrofobnog/hidrofilnog karaktera površine mikročestica. Na močivost čvrstog materijala (u ovom kontekstu mikročestica) utječe površinska napetost čvrstog materijala, površinska napetost tekućine i međufazna napetost. Ukoliko je vrijednost kontaktnog kuta < 90 °, radi se o hidrofilnoj površini, dok je kontaktni kut > 90 ° indikator hidrofobne površine, a time i veće međufazne napetosti između tekućine i čvrstog materijala (Menzies i Jones, 2010). Rezultati kontaktnih kuteva < 90 ° kod AG i GG inkapsulata upućuju na dobru močivost površine, a što se može objasniti hidrofilnim karakterom polisaharidnih nosača uslijed prisutnosti velikog broja hidroksilnih funkcionalnih grupa šećernih komponenti. Sharkawy i sur. (2019) dobili su nešto više vrijednosti kontaktnog kuta (95,2 °) za nanočestice na bazi arapske gume i kitozana (4:1), a što je posljedica uvođenja hidrofobnijeg kitozana u odnosu na arapsku gumu. I u ovom istraživanju primijećen je sličan učinak, samo u suprotnom kontekstu povećanja kontaktnog kuta prilikom supstitucije dijela arapske i djelomično hidrolizirane guar gume s hidrofobnijom karboksimetil celulozom (AG_KMC: 89,67 °, GG_KMC: 90,50 °). Le i sur. (2022) su u svom istraživanju dobili više vrijednosti za guar gumu

tijekom prvih 10 sekundi mjerenja (90 °). S druge strane, Rahman i sur. (2021) odredili su dobru močivost biorazgradivog filma na bazi guar gume i kitozana (73,4 °), a vrijednost kontaktnog kuta je bila gotovo identična za 100%-tni kitozan (75,4 °). Varijabilne vrijednosti mogu se objasniti određenim razlikama u kemijskom sastavu korištenih polimera unatoč standardiziranoj proizvodnji i ciljanoj modifikaciji svojstava uvođenjem polimera specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava. Kod svih KMC uzoraka, primjećuje se hidrofoban karakter površine odnosno niska močivost ($\Theta > 90^\circ$). Karboksimetil celuloza je modificirani derivat celuloze umjereno hidrofobnog karaktera koji se koristi za poboljšanje barijernih svojstava kod ambalažnih filmova (Hashmi i sur. 2012; Liu i sur., 2021). Nadalje, priprema uzorka i rezultirajuća hrapavost površine mikročestica može utjecati na neke veće vrijednosti kontaktnih kutova (Nadeem i sur., 2023). S druge strane, dodatak hidroliziranog kolagena (KMC_KOL) i karagenana (KMC_KAR) u otopinu karboksimetil celuloze povećao je močivost, odnosno smanjio kontaktni kut, a što se može objasniti amfifilnom prirodom hidroliziranog kolagena i prisutnošću sulfatnih grupa kod karagenana za povećanje elektrostatskih interakcija s karboksimetil celulozom, ali i hidrofobnijom prirodom karboksimetil celuloze u odnosu na hidrolizirani kolagen i karagenan. Tako su primjerice, Shahbazi i sur. (2016) upotrijebili su karagenan za modifikaciju močivosti biorazgradivih filmova na bazi hidrofilnijeg kitozana, uz uspješno povećanje hidrofobnosti površine prema vrijednostima kontaktnih kutova za film na bazi kitozana (Θ : 39 °), odnosno kitozana/ κ -karagenana (Θ : 67,8 °). Sličan učinak postignut je i ovom radu kod AG inkapsulata (AG: 62,50 °, AG_KAR: 68,50 °) i GG inkapsulata (GG: 66 °, GG_KAR: 86,00 °).

Prosječna veličina mikročestica važan je parametar za procjenu daljnje uporabe praškastih dozirnih sustava, a osobito u kontekstu farmaceutske aplikacije (prahovi za inhalaciju, prahovi za dermatološku primjenu, prahovi za direktnu komprimaciju i sl.). Ovaj parametar može ovisiti o atomizacijskom procesu prilikom sušenja raspršivanjem i fizikalnim svojstvima nosača (Goula i Adamopoulos, 2004; Castro-López i sur., 2021). Manja veličina čestica povezana je s većom kontaktnom površinom dostupnom za hidrataciju. U kontekstu primjene inkapsulata u prehrambenoj industriji, bitne razlike u prosječnoj veličini čestica nisu detektirane između analiziranih inkapsulata na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze obzirom da su vrijednosti iznosile od 3 do 10 μm . Rezultati prosječne veličine mikročestica za inkapsulate na bazi arapske gume usporedivi su s onima u literaturi (Martinić i sur., 2022; Ribeiro i sur., 2019; Remígio i sur., 2024).

Morfološki izgled inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem ovisi o brzini isparavanja otapala, mehanizmu solidifikacije i veličini mikročestica, a koji su određeni

reološkim svojstvima polimernih otopina, fizikalno-kemijskim interakcijama između polimernih nosača i aktivnih komponenti te postavljenim procesnim parametrima (Vehring, 2008).

Sve formulacije na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze rezultirale su manje ili više aglomeriranim strukturama. Aglomeracija je fizikalni proces povezivanja dviju ili više kapljica u dovoljno dugom vremenu da se stvori tzv. “viskozni most” i/ili da dođe do solidifikacije u amorfnu česticu. Među ostalim, istraživanja na području primjene sušenja raspršivanjem usmjerena su i na detekciju faze i/ili parametra procesa važnog za određivanje tendencije aglomeracije, poput određivanja udaljenosti generiranih kapljica od mlaznice, optimalne površine kapljice za efikasno uklanjanje otapala, karakteristika polimera i otopine poput temperature staklastog prijelaza, viskoelastičnosti, površinske napetosti, kontaktnog kuta i dr. (Palzer, 2009; Palzer, 2011). Aglomerirane strukture mogu imati pozitivan učinak na stabilnost i otpuštanje ciljanih spojeva uslijed formiranja vanjskog, zaštitnog sloja čestica (Dhanalakshmi i sur., 2011; Alves i sur., 2017). Konkavni oblici, naborana i hrapava površina mikročestica morfološke su karakteristike primjene arapske gume kao polimernog nosača (Martinić i sur., 2022; Kuck i Noreña, 2016). Naborana struktura i konkavni izgled može biti posljedica naglog gubitka vlage pri trenutnom isparavanju atomiziranih kapljica u kontaktu s konvekcijskim medijem (Rezende i sur., 2018). Uvođenjem karboksimetil celuloze, vidljivo je značajno smanjenje zastupljenosti deformiranih mikročestica uz povećanje sferičnog oblika i glatke površine te smanjenje aglomeracije. Remígio i sur. (2024) također su formulirali mikročestice na bazi karboksimetil celuloze sličnih morfoloških karakteristika. Inkapsulati na bazi djelomično hidrolizirane guar gume rezultirali su glatkom površinom, ovalnim i sferičnim oblikom mikročestica (Kuck i Noreña, 2016). Također, uočene su i slijepljene strukture inkapsulata (GG, GG_KOL, GG_KAR), a što je vjerojatno posljedica izražene higroskopnosti korištenih polimernih materijala. Uvođenje karboksimetil celuloze očito je modificiralo fizikalno-kemijska svojstva obzirom na dominaciju uniformnih mikročestica pravilnog oblika. Formulacije na bazi karboksimetil celuloze rezultirale su mikročesticama pravilnog i sferičnog oblika, ali manje uniformnosti i visoke tendencije aglomeriranju. Prisutnost udubina i ruptura unutar struktura detektirana je kod uzoraka KMC, KMC_KOL i KMC_GG, AG_KMC i GG_KMC. Slični rezultati dobiveni su za inkapsulate na bazi karboksimetil celuloze u studiji Castro-López i sur. (2021), a koji su rezultirali aglomeriranim strukturama s površinskim udubljenjima. Hrapava površina kod uzorka KMC_KAR može se povezati s morfološkim utjecajem prilikom uvođenja karagenana (Baltrusch i sur., 2022), no bez pojave zgrudnjavanja kao što je utvrđeno u radu Tsirigotis-

Maniecka i sur. (2020) prilikom inkapsulacije ekstrakta brusnice. U tom slučaju, dodatak arapske gume nije imao negativan utjecaj na formiranje konkavnih oblika s hrapavom površinom. Nadalje, može se uočiti korelacija između visokih vrijednosti indeksa polidisperzije i vizualizacije aglomeriranih struktura kod svih analiziranih inkapsulata. Glatka površina i odsutnost pora poželjne su kvalitete koje mogu uvelike utjecati na sprječavanje oksidacije spojeva od interesa i smanjenu interakciju s drugim mikročesticama (Cabral i sur., 2018).

5.5.3. ATR-FT-IR spektri funkcionalnih skupina nosača i inkapsulata

Fizikalno-kemijska karakterizacija ekstrakta trave ive, korištenih polimera i inkapsulata na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze ukazuje na prisutnost karakterističnih funkcionalnih skupina.

FT-IR spektar *ekstrakta trave ive* (LE) rezultirao je većim brojem karakterističnih apsorpcijskih vrpca za polifenolne spojeve u rasponu valnog broja od 900-1800 cm^{-1} . Višestruke preklapajuće vrpce, s maksimumom apsorpcije pri 1027 cm^{-1} , posljedica su C-O-C i C-O simetričnog rastezanja veza, čime se potvrđuje prisutnost glikozidnih veza unutar feniletanoidnih glikozida između hidroksitirosoila i šećera. Široka vrpca izraženog intenziteta pri ~ 3500 cm^{-1} potvrđuje prisutnost hidroksilnih skupina uključenih u intra- i intermolekularne veze. Detektirane vrpce pri 1259 cm^{-1} (C-O), 1375 cm^{-1} (C-H; O-H), 1589 cm^{-1} (C-C; C=C), 2930 cm^{-1} (C-H) i 3275 cm^{-1} (O-H) mogu se pripisati aromatskim strukturama polifenolnih spojeva, ali i drugih biljnih metabolita istog profila funkcionalnih veza.

Funkcionalne skupine polimera *karboksimetil celuloze* (KMC*) odgovaraju onima u literaturi (Cuba-Chiem i sur., 2008, Castro-López i sur., 2021). Vrpce pri maksimumu od 3250, 1589, 1413 i 1324 cm^{-1} pripisuju se prisutnosti asimetričnog i simetričnog rastezanja hidroksilnih skupina unutar H-veze ili rastezanja O-H podrijetlom iz karboksilnih skupina. Maksimum pri 1019 cm^{-1} predstavlja istežanje C-O-C veza u celuloznoj okosnici.

U FT-IR spektru *arapske gume* (AG*) mogu se uočiti vrpce relativno visokog intenziteta pri 3311, 2926, 1597 i 1015 cm^{-1} , a koje odgovaraju O-H skupinama, C-H istežanju, COO- asimetričnom istežanju, C-O-C- istežanju glikozidnih veza i O-H istežanju u polisaharidnim lancima (Moghadam i sur., 2021).

U FT-IR spektru *djelomično hidrolizirane guar gume* (GG*) detektirana je intenzivna i široka vrpca na 3232 cm^{-1} koja odgovara istežanju slobodnih i vezanih hidroksilnih skupina. Nadalje, maksimumi pri 2937 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} i 1331 cm^{-1} mogu se povezati sa istežanjem C-H veze unutar okosnice polimera galaktomanana. Maksimumi visokog intenziteta

u rasponu između 400-1200 cm^{-1} (1152 cm^{-1} , 1009 cm^{-1} , 914 cm^{-1} , 851 cm^{-1} , 769 cm^{-1} , 511 cm^{-1}) odgovaraju rastezljivim vibracijama $\beta(1\rightarrow4)$ i $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidnih veza između jedinica manoze i galaktoze, kao i OH- savijanju unutar alkoholnih i karboksilnih skupina (Mudgil i sur., 2012; Anjum i sur., 2021). Karakteristične apsorpcijske vrpce uočene su za **hidrolizirani kolagen** (KOL*), tj. amid I pri 1630 cm^{-1} (dominantno rastezanje C=O unutar peptidnih veza duž okosnice), amid II pri 1524 cm^{-1} (primarno N-H savijanje primarnih amina u peptidima u ravnini, zajedno s C-N i C-C rastezanjem) i amidom III pri 1240 cm^{-1} (C-N istežanje sekundarnih amida). Također, detektirani su i amid A (3270 cm^{-1}) i amid B (2941 cm^{-1}) koji predstavljaju asimetrično rastezanje funkcionalnih skupina C-H₂, O-H i N-H₂ (Ficai i sur., 2013).

Kod **kappa-karagenana** (KAR*), široka apsorpcijska vrpca (3100-3700 cm^{-1}) s maksimumom pri 3408 cm^{-1} odgovara O-H istežanju, dok vrpca između 1210-1260 cm^{-1} (maksimum pri 1219 cm^{-1}) upućuje na prisutnost sulfatnih estera (Chopin i sur., 1999). Detektirani maksimumi pri 923 cm^{-1} i 846 cm^{-1} pripisuju se ostatku 3,6-anhidro-galaktoze odnosno D-galaktoza-4-sulfatu. Osim toga, intenzivne vrpce između 1148-1028 cm^{-1} i 800-700 cm^{-1} vjerojatno su posljedica istežanja i savijanja piranoznih jedinica unutar polisaharidnih lanaca karagenana (Gómez-Ordóñez i Rupérez, 2011; Guo i sur., 2023).

FT-IR spektri svih AG, GG i KMC inkapsulata bez ekstrakta pokazali su iste apsorpcijske vrpce kao bazni nosači (100 % ili 75 % udjela na ukupnu masu polimera), a što je rezultat njihove dominantne prisutnosti u formulacijama. Detektirani su pomaci karakterističnih maksimuma u svim AG inkapsulatima bez ekstrakta u odnosu na: a) AG*, kako slijedi: AG – 3301 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} , AG_KOL – 3277 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} , AG_KAR – 3300 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} , AG_KMC – 3302 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} , 1023 cm^{-1} , b) GG*, kako slijedi: GG – 3262 cm^{-1} , 1443 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} , GG_KOL – 3280 cm^{-1} , 1443 cm^{-1} , 1358 cm^{-1} , GG_KAR – 3235 cm^{-1} , 1409 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} , GG_KMC – 3270 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} , uz preklapanje novih i postojećih vrpca u području valnih brojeva od 1200 do 500 cm^{-1} , c) KMC*, kako slijedi: 3260 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} i 1023 cm^{-1} , KMC_AG - 3287 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} i 1027 cm^{-1} , KMC_GG - 3264 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , KMC_CLG - 1326 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , KMC_KAR - 3247 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} i 1023 cm^{-1} . Takve su promjene djelomično povezane s uvođenjem sekundarnih polimera, uz posljedično stvaranje intermolekulskih interakcija, npr. vodikovih veza između hidroksilnih ili karboksilnih skupina polisaharidnih lanaca te polarnih skupina unutar hidroliziranog kolagena, kao i povećan intenzitet rastežanja dominantnih glikozidnih veza.

FTIR spektri inkapsulata s ekstraktom trave ive nisu pokazali nove apsorpcijske vrpce. Međutim, primijećeno je relativno smanjenje intenziteta apsorpcijskih vrpca pri maksimumu od 3275 cm^{-1} i 1589 cm^{-1} te u "području apsorpcije funkcionalnih grupa šećera", tj. 1409 cm^{-1} , 1323 cm^{-1} i 1027 cm^{-1} , a što ukazuje na prisutne interakcije između polimernih nosača i komponenti ekstrakta, uslijed formiranja vodikovih veza (He i sur., 2020). Do sada su mnoge studije dokazale da je nekovalentna interakcija između polifenola i polisaharida ili proteina uglavnom rezultat formiranja vodikovih veza, zajedno s hidrofobnim interakcijama, elektrostatskim interakcijama i van der Waalsovima silama (Amoako i Awika, 2016; Dobson i sur., 2019).

5.5.4. Toplinska svojstva nosača i inkapsulata

Analiza razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) nije ukazala na promjene entalpije direktno povezane s prisutnošću faznih promjena istraživanih polimera i inkapsulata na bazi arapske gume, djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze. Nije detektirana niti prisutnost temperature staklastog prijelaza (T_g) karakteristična za amorfne, organske biopolimere, kao važan parametar polimernih materijala koji potencijalno može ograničiti njihovo korištenje u kontekstu sušenja raspršivanjem. S druge strane, Kuck i Noreña (2016) odredili su T_g između 45 i 52 °C mikročesticama na bazi arapske gume (10 %) i djelomično hidrolizirane guar gume (10 %), obogaćenima polifenolnim ekstraktom iz kože grožđa. Na vrijednost temperature staklastog prijelaza značajno utječe molekularna masa polimera, kemijska struktura i udjel vode dok prisutnost ekstrakata voćnog ili biljnog podrijetla dodatno može sniziti T_g uslijed visokog udjela šećera niske molekulske mase i organskih kiselina (de Barros Fernandes i sur., 2014; Adhikari i sur. 2004). DSC analiza na mikročesticama karboksimetil celuloze (1 %) obogaćenima polifenolnim ekstraktom *Moringe oleifere*, kao i na samom polifenolnom ekstraktu dobivenom pri istim procesnim uvjetima sušenja raspršivanjem nije pokazala endotermne fazne prijelaze, niti T_g (Castro-López i sur., 2021), osim širokog pika kao indikatora isparavanja vode uslijed higroskopsnosti polimera i inkapsulata. Vargas-Muñoz i sur. (2020) utvrdili su povećanje T_g inkapsuliranog koncentrata pulpe tropskog voća cocone uvođenjem hidroliziranog kolagena i maltodekstrina (80:20) primjenom sušenja raspršivanjem i tako smanjili ljepljivost, aglomeraciju i degradaciju polifenola pulpe u odnosu na neinkapsulirani ekstrakt. Osim fizikalnih parametara, vrlo je bitno odrediti vrijednosti T_g za planiranje uvjeta skladištenja hidrofilnih i higroskopsnih inkapsulata u cilju izbjegavanja apsorpcije vlage koja ima plastificirajući učinak te sprječavanja prelaska T_g ,

a što bi dovelo do sljepljivanja, kristalizacije prisutnih šećera i destabilizacije inkapsulata (Fongin i sur., 2017).

5.5.5. Bioaktivna svojstva inkapsulata

Inkapsulacijska učinkovitost (IU) jedan je od najvažnijih parametara za određivanje potencijala polimernih nosača u zadržavanju komponenti od interesa, a ovisi o kemijskoj strukturi i koncentraciji polimernih nosača, reološkim karakteristikama, interaktivnom potencijalu prema komponenti od interesa, vrsti otapala, pH, inkapsulacijskoj tehnici, prisutnosti agensa za umrežavanje i procesnim parametrima i dr. (Jyothi i sur., 2010). Binarni polimerni sustavi na bazi djelomično hidrolizirane guar gume omogućili su najučinkovitije zadržavanje komponenti od interesa, a slijede ih sustavi na bazi arapske gume te karboksimetil celuloze. Kuck i Noreña (2016) također su dobili najviše vrijednosti IU za TPC (81,4-95,3 %) i ukupne antocijane (80,75-99,58 %) prilikom inkapsulacije ekstrakta pokožice grožđa korištenjem arapske gume (10 %) i djelomično hidrolizirane guar gume (10 %) kao polimernih nosača pri nešto nižoj ulaznoj temperaturi sušenja (140 °C). Visoka učinkovitost zadržavanja polifenola arapske gume pripisuje se razgranatosti strukture i prisutnosti glikoproteina za ostvarivanje elektrostatskih interakcija. Martinić i sur. (2022) dobili su relativno nisku IU ukupnih hidroksicimetnih kiselina (42,80-58,99 %) i TPC-a (35,38-42,12 %) prilikom inkapsuliranja polifenolnog ekstrakta maslačka korištenjem arapske gume i guar gume (ulazna temperatura: 130 °C, 8 mL h⁻¹). Prilikom inkapsulacije polifenolnog ekstrakta *Moringe oleifere* korištenjem karboksimetil celuloze (1 %), karboksimetil celuloze+tragakant gume (0,5 % + 0,5 %) i karboksimetil celuloze + lokust gume (0,5% + 0,5%), Castro-López i sur. (2021) dobili su oko tri puta niže vrijednosti TPC-a (25,17-27,26 %) nego u ovom radu (70,82-88,64 %), pri ulaznoj temperaturi od 120 °C i protoku otopine od 8 mL h⁻¹. Brojna istraživanja upućuju na utjecaj odabira jednog ili kombinacije polimernih nosača, njihove molekulske mase, vrste funkcionalnih skupina, stupnja umreženosti, ali i procesnih parametara za ostvarivanje interakcija sa strukturama polifenola (Mahdavi i sur., 2016; Liu i sur., 2020). Tako su primjerice Leyva-Jiménez i sur. (2020) optimizacijom sušenja raspršivanjem (ulazna temperatura sušenja: 135-195 °C, omjer ekstrakta i nosača: 4,16-13,84) uz inulin i maltodekstrin kao polimerne nosače, dobili visoku inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta limunske verbene bogatog feniletanoidnim glikozidima (> 71 %), s verbaskozidom kao najzastupljenijim spojem. Optimalnim parametrima definirani su: ulazna temperatura sušenja od 134,75 °C, samostalno korišteni maltodekstrin kao nosač te maksimalan omjer uzorka i nosača (13,84).

Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim *in vitro* uvjetima razlikovala se ovisno o binarnim polimernim sustavima, pri čemu je uvođenje karboksimetil celuloze u otopinu arapske gume i guar gume, kao i korištenje karboksimetil celuloze kao baznog nosača (75 %, w/w), značajno prolongiralo otpuštanje polifenolnih spojeva iz dozirnih sustava. Inkapsulati na bazi karboksimetil celuloze također su rezultirali povoljnom, odnosno produljenom kinetikom otpuštanja spojeva od interesa. Martinić i sur. (2022) odredili su sličan profil otpuštanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrakta maslačaka iz formuliranih mikročestica na bazi guar gume (4 %) i arapske gume (4 %) s ubrzanom i nekontroliranom kinetikom (potpuno otpuštanje u prvih 5-20 minuta), kao i u ovom istraživanju, dok su primjerice, Chaumon i sur. (2020) odredili čak 80 % TPC-a otpuštenih u prve tri minute iz mikročestica na bazi arapske gume (1 %) obogaćenih polifenolnim ekstraktom lovora, dok je korištenje modificiranog kitozana (9 min) i natrijevog alginata (20 minuta) u istom postotku usporilo otpuštanje polifenola. S druge strane, Tchabo i sur. (2022) primjenom matematičkog modela odredili su povoljniju kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva lista murve iz mikročestica na bazi Na-karboksimetil celuloze (0,75 %) nego u slučaju rezultatima dobivenima u ovom istraživanju.

Bioraspoloživost značajno ovisi o složenosti kemijske strukture polifenola, stupnju asocijacije između polifenola i nosača (u ovom kontekstu polisaharida) te dostupnosti polisaharida od strane probavnih enzima (Jakobek, 2015). Poželjan profil otpuštanja TPC-a iz formuliranih inkapsulata na bazi karboksimetil celuloze te supstitucija arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume u udjelu od 25 % na ukupnu masu polimera (w/w) može se pripisati manjoj močivosti inkapsulata obzirom na određene kontaktne kuteve (90 ° za AG_KMC te GG_KMC i > 105 ° KMC sustave). Hidrofobnija površina značajno umanjuje učinkovitost interakcije komponenata inkapsulata s korištenim probavnim enzimima u hidrofilnom okruženju, a prolongirano otpuštanje TPC-a može se pripisati i učinkovitoj fizikalno - kemijskoj modifikaciji sustava na bazi arapske gume i djelomično hidrolizirane guar gume uslijed prisutnosti karboksimetil celuloze te formiranim vodikovim vezama između velikog broja karboksilnih skupina karboksimetil celuloze i šećernih komponenti feniletanoidnih glikozida iz ekstrakta trave ive. Polifenoli imaju visoki afinitet za stupanje u interakcije s polisaharidima poput celuloze, pektina i topljivih vlakana kroz vodikove veze i hidrofobne interakcije, pri čemu značajnu ulogu u vezanju ima kemijska struktura polifenola te poroznost i površinska svojstva polisaharida (Jakobek, 2015; de Barros Fernandes i sur., 2014). Naglašava se i pozitivan utjecaj kompleksacije polisaharida s polifenolima u vidu poboljšanja

bioraspoloživosti i biodostupnosti u intestinalnom dijelu probave, odnosno kontakta s crijevnom mikrobiotom (Wan i sur., 2022).

Potencijal cijepanja glikozidnih veza unutar feniletanoidnih glikozida uslijed hidrolize i prisutnosti enzima u gastrointestinalnim uvjetima također se mora uzeti u obzir pri tumačenju kinetike otpuštanja spomenutih spojeva, kao derivata kafeinske kiseline. Stupanj razgradnje uvelike ovisi o kompleksnoj strukturi istoimenih spojeva, odnosno broju vezanih šećera, broju esterskih i eterskih veza, prostornim konformacijama šećera, tipovima glikozidnih veza itd. (Jiang i sur., 2016). Primjerice, u radu Wei i sur. (2021) utvrđena je stabilnost i visoka bioraspoloživost fenetil estera kafeinske kiseline u intestinalnim uvjetima simulirane probave (pH=7). Relativno očuvani udjel TPC-a oslobođenih na kraju intestinalne faze (rezultati izračunati obzirom na jednadžbu baždarne krivulje za ehinakozid), navodi na zaključak očuvanja stabilnosti feniletanoidnih glikozida pri analiziranim uvjetima.

5.6. Inkapsulacija ekstrakta trave ive elektroispredanjem

5.6.1. Reološka karakterizacija otopina nosača

Pored viskoznosti, površinske napetosti i električne konduktivnosti, molekularna masa i koncentracija polimera predstavljaju najbitnije parametre u optimiranju morfoloških karakteristika nanovlakana. Elektroispredajući potencijal polimernih otopina definiran je stupnjem molekulske isprepletenosti koji je u linearnoj korelaciji s duljinom polimernih lanaca, molekulskom masom i viskoznošću, ali i elastičnosti polimerne mreže kao posljedice limitirane fluktuacije polimernih lanaca uslijed prisutnosti agensa za umrežavanje i/ili topoloških te kohezijskih ispreplitanja (Tan i sur., 2005; Rubinstein i Colby, 2003). Sukladno navedenom, variranjem udjela elastične komponente u polimernom sustavu značajno se može neutralizirati fenomen Rayleighove nestabilnosti, odnosno omogućiti formiranje prolongiranog polimernog mlaza u kojem polimerni lanci posjeduju određeni stupanj asocijacije, a što je glavni preduvjet za stvaranje vlakana (Ramakrishna i sur., 2005). Obzirom na biorazgradivost, linearnu polimernu strukturu i hidrofilnost, pululan je jedan od najčešće korištenih polimera u elektroispredanju na bazi vode, bez upotrebe toksičnih, organskih otapala. U cilju funkcionalizacije fizikalno-kemijskih i reoloških svojstava otopine za proizvodnju nanovlakana specifičnih karakteristika, pululan se uspješno kombinirao i sa sintetskim polimerima poput polietilen oksida (Duan i sur., 2023) i polivinil klorida (Qian i sur., 2016) te biopolimerima poput želatine (Wang i sur., 2019), proteina amaranta (Aceituno-Medina i sur., 2013), proteina graška (Aguilar-Vázquez i sur., 2018), proteina sirutke (Drosou i sur., 2018), kitozanom (Qin i

sur., 2019), hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (Poudel i sur., 2020) i dr., a formuliranjem binarnih polimernih otopina pululana sa hidroliziranim kolagenom, zeinom i proteinima konoplje u ovom radu, omogućena je optimizacija reoloških svojstava za formiranje nanovlakana namijenjenih razvoju obogaćenih funkcionalnih proizvoda.

Prema rezultatima *reološke karakterizacije polimernih otopina* na bazi pululana i hidroliziranog kolagena (PUL:KOL), utvrđena je konstantna viskoznost unutar primijenjenog područja brzine smicanja, a što je odlika viskoznih, Newtonovskih fluida. Povećanje udjela hidroliziranog kolagena dodatno je snizilo viskoznost PUL:KOL otopina, a što je direktna posljedica prisutnosti skraćenih peptida umjesto dugih polipeptidnih lanaca želatine sposobnih stvarati efikasne interakcije s linearnim polisaharidnim lancima pululana. Poudel i sur. (2020) utvrdili su Newtonovsko ponašanje otopina pululana do 8 %-tne koncentracije, dok je udjel pululana od 10-25 % rezultirao slabim pseudoplastičnim ponašanjem. U obzir treba uzeti i veći rang brzine smicanja $0,01-100 \text{ s}^{-1}$ -nego što je primijenjen u ovom radu, a u kojem je samostalno primijenjeni pululan (12PUL) ipak rezultirao Newtonovskim ponašanjem ($1-100 \text{ s}^{-1}$). Vizualno uspješno elektroispredanje tako je postignuto za sve PUL:KOL otopine, osim kod polimernog sustava 20PUL:80KOL s najnižom izmjerenom viskoznošću. S druge strane, kod svih polimernih otopina na bazi pululana i zeina (PUL:ZE) te pululana i proteina konoplje (PUL:PK) stabiliziranih suncokretovim lecitinom, utvrđeno je povećanje prividne viskoznosti povećanjem udjela zeina i proteina konoplje, kao i pseudoplastično ponašanje. S druge strane, Aguilar-Vázquez i sur. (2018) su na formulacijama otopina pululana i proteina graška (PG) utvrdili značajan učinak povećanja viskoznosti i stupnja interakcija između polimera samo kod 50PUL:50PG te 80PUL:20PG. Uočen je i pozitivan utjecaj dodatka lecitina (10PUL+lec) na formiranje viskoelastičnog fluida te, posljedično, poboljšanje elektroispredivosti uzorka 10PUL. Nadalje, dodatkom proteina konoplje i zeina, uz prisutnost lecitina, povećana je prividna viskoznost binarnih polimernih sustava kroz stvaranje vodikovih i hidrofobnih intermolekulskih veza između hidrofilnih polisaharidnih jedinica pululana i polipeptidnih lanaca proteina čime je omogućeno povećanje stupnja umreženosti polimernih lanaca (Aydogdu i sur., 2017; Gradzielski, 2023), a što je kasnije i potvrđeno oscilacijskim testovima. Istraživanja usmjerena prema modifikaciji reoloških svojstava otopina za elektroispredanje dodatkom lecitina su limitirana, a ona dostupna usmjerena su na emulzijske sustave s ciljem poboljšanja elektroispredivosti, morfologije „core-shell” nanovlakana te optimizacije kinetike otpuštanja bioaktivnih spojeva (Li i sur., 2024; Lin i sur., 2024). Upravo su amfifilna svojstva fosfolipidnih struktura odgovorna za uspostavljanje nekovalentnih interakcija između proteina i polisaharida, a što je u konačnici i definiralo njegovu nezamjenjivu ulogu u optimizaciji

reoloških svojstava, jačanju i poboljšanju teksturalnih svojstava gel matriksa (Lin i sur., 2020), te razvoju funkcionalnih i visokostabilnih oleogelova za poboljšanje biodostupnosti polifenolnih spojeva (Ma i sur., 2024).

U cilju dodatne karakterizacije viskoelastičnih sustava PUL:ZE te PUL:PK, neophodno je odrediti područje njihove strukturne stabilnosti mjerenjem linearnog viskoelastičnog područja (LVE) unutar definiranog ranga smične deformacije (γ). Povećanje udjela zeina i proteina konoplje iznad 50 % dovelo je do značajnog restrukturiranja polimerne strukturne mreže u vidu povećanja elastičnog karaktera, tj. stabilnosti umrežene strukture duž cijelog frekvencijskog raspona ($\tan \delta < 1$) i posljedično, povećanja prividne viskoznosti. Luo i sur. (2021) također su potvrdili značajno povećanje intermolekularnih interakcija uvođenjem zeina (15-30%) u polimerni sustav na bazi dekstrana, ali i smanjenje prividne viskoznosti. Oscilacijsko mjerenje provedeno u prethodno određenom linearnom viskoelastičnom području pružilo je daljnji uvid u umreženost polimernih lanaca i detekciju relaksacijskih vremena u rangu primijenjenih kutnih frekvencija (0,1-100 rad s⁻¹). Uvođenje lecitina u polimernu otopinu pululana (15PUL+lec) je statistički značajno ($p < 0,05$) povećalo elastičnost sustava stabilnog tijekom cjelokupnog primijenjenog ranga frekvencija u odnosu na samostalni pululan (15PUL), ali i njegovu prividnu viskoznost što se u konačnici negativno odrazilo na elektroispredivost ove kombinacije. Sličan trend uočen je i kod uzoraka 15ZE i 15ZE+lec koji su rezultirali čvrstim gel sustavima nakon duljeg vremena stajanja, a što je lako uočljivo obzirom na krivulje modula pohrane pri nižim frekvencijama. Uzorci 30PUL:70ZE i 20PUL:80ZE pokazali su elastičan karakter pri cijelom frekvencijskom rasponu s dodatnim povećanjem elastične komponente pri manjim frekvencijama, a što je i karakteristika polimernih sustava visokog stupnja umreženja. S druge strane, kod polimernih sustava 70PUL:30ZE, 60PUL:40ZE, 50PUL:50ZE i 40PUL:60ZE, vidljivo je “ispreplitanje” krivulja za G' i G'' sustave, a što ukazuje na podjednaku dominaciju i viskozne i elastične komponente ovisno o primijenjenoj kutnoj frekvenciji. Pri visokim frekvencijama (100 i 63,1 rad s⁻¹), određena su i relaksacijska vremena za iste otopine (0,010-0,016 s). Relaksacijsko vrijeme (t_R) je karakteristično vrijeme u kojem viskoelastični polimeri postižu ravnotežu nakon primjene vanjske sile, odnosno vrijeme potrebno za “uklanjanje” deformacije polimernom sustavu naizmjeničnim kretanjem isprepletenih polimernih lanaca u cilju povratka sustava u ravnotežu, te je u direktnoj relaciji s molekulskom masom, stupnjem umreženosti i prisutnim interakcijama te mobilnošću polimernih lanaca. Premda u primijenjenom rasponu frekvencija nisu zabilježena relaksacijska vremena za sve otopine, a što je ujedno i indikator potrebe za produljenjem raspona u sljedećim eksperimentima, vrijednosti za već spomenute sustave mogu se usporediti sa zabilježenim t_R za

sustave 70PUL:30PK (10 s pri 0,100 rad s⁻¹), 60PUL:40PK (3,98 s pri 0,251 rad s⁻¹) i 50PUL:50PK (0,01 s pri 63,1 rad s⁻¹). Vidljivo je da su navedeni PUL:PK uzorci pokazali nešto veća relaksacijska vremena u odnosu sustave PUL:ZE, odnosno izraženiji elastični karakter. U kontekstu elektroispredanja, veće relaksacijsko vrijeme pozitivno korelira s poboljšanjem elektroispredivosti otopina visoke površinske napetosti (Ewaldz i sur., 2021). Nadalje, primjena proteina konoplje udjelom ≤ 40 % u ukupnoj masi polimera dovela je i do formiranja slabo do dobro strukturiranih modela polimera. Dominacija viskozne nad elastičnom prirodom ($G'' > G'$) može se uočiti za polimerne sustave 80PUL:20PK, 70PUL:30PK i 60PUL:40PK u većem dijelu primijenjenog frekvencijskog raspona. Detektirane razlike u reološkim karakteristikama polimernih sustava mogle bi igrati važnu ulogu u stabilizaciji polimernog mlaza i konačnoj kvaliteti morfologije nanovlakana (Ghorani i sur., 2020).

5.6.2. Fizikalna karakterizacija otopina nosača

Premda postoji statistički značajna razlika u izmjerenoj konduktivnosti unutar pojedinih polimernih sustava, prisutno smanjenje ili povećanje ove fizikalne veličine u ovom slučaju nije utjecalo na učinkovitost elektroispredanja otopina. Primjerice, **konduktivnost** za uzorak 15ZE bila je vrlo slična izmjernim vrijednostima kod uzoraka 12PUL i 20PUL:80ZE, a koje su, unatoč tome, pokazale visok potencijal u formiranju nanovlakana. Sličan trend primijećen je i kod **površinske napetosti** za sve polimerne sustave. Budući da je površinska napetost sila na slobodnoj površini tekućine koja se suprotstavlja primijenjenom električnom naponu, izmjerene su poželjno niske vrijednosti kod svih polimernih otopina za ostavriavanje preduvjeta elektroispredanja (25-41 mN m⁻¹), a koje uz odgovarajuću konduktivnost i reološka svojstva, pogoduju stvaranju stabilnih i elongiranih polimernih mlazova za elektroispredanje (Andrarry, 2008; Williams i sur., 2018b). Zanimljivo je da je površinska napetost vodenog polifenolnog ekstrakta (36,19 mN m⁻¹) bila gotovo nepromijenjena u usporedbi s istim ekstraktom pripremljenim s 50%-tnom ledenom octenom kiselinom (v/v) (37,79 mN m⁻¹), a što ukazuje na prisutnost površinski aktivnih spojeva u ekstraktu. Očekivano, dodatak suncokretovog lecitina dodatno je smanjio površinsku napetost u uzorcima 10PUL+lec i 15PUL+lec u odnosu na uzorke 12PUL i 15PUL. U radu Chi i sur. (2022) električna konduktivnost za sustave na bazi kolagena i PVA (12 %) kretala se u rangu od 0,2 mS cm⁻¹ za 100 %-tni PVA do 2,5 mS cm⁻¹ za 100 %-tni kolagen, dok je površinska napetost bila između 32,68-39,05 mN m⁻¹. Premda su vrijednosti za obje fizikalne veličine u skladu s rezultatima ovoga istraživanja, u ranije navedenom radu formirana su nanovlakna tek povećanjem PVA udjela iznad 50 %. Aceituno-

Medina i sur. (2013) istraživali su različite omjere binarnih sustava pululana i amarant proteina (20 %) u mravljoj kiselini (95 %, v/v), a nanovlakna su uspješno dobivena pri svim kombinacijama osim pri najvećem udjelu proteina (80 % na ukupnu masu polimera). Utvrdili su smanjenje konduktivnosti otopina povećanjem udjela pululana (5,4-6,8 mS cm⁻¹), smanjenje viskoznosti povećanjem amarant proteina (313-587 mPa·s), dok su vrijednosti površinske napetosti bile gotovo nepromijenjene (30,9-32,4 mN m⁻¹). Istraživani su i binarni sustavi pululana i proteina graška u vodi pri lužnatim uvjetima (Aguilar-Vázquez i sur., 2018). Vrijednosti površinske napetosti bile su znatno veće (48-81,20 mN m⁻¹) dok je, slično kao i u prethodnom primjeru, uočeno smanjenje konduktivnosti povećanjem udjela pululana (3,96-10,20 mS cm⁻¹). Uspješno proizvedena nanovlakna povezana su s dovoljno visokom viskoznošću uslijed povećanja udjela pululana te smanjenom konduktivnosti otopina.

Zaključno, izmjerene vrijednosti konduktivnosti i površinske napetosti u skladu su s uvjetima uspješnog izvođenja procesa elektroispredanja i proizvodnju morfološki prikladnih nanovlakana (Seethu i sur., 2020; Liu i sur., 2022).

5.6.3. Fizikalni parametri inkapsulata

Zeta potencijal je fizikalno svojstvo koloidnih sustava, a odnosi se na prisutnost elektrostatskog naboja na površini čestica dispergiranih u tekućoj fazi. Indikator je stabilnosti disperzije, ali i potencijala prema aglomeriranju čestica (Attama i sur., 2007). U ovom istraživanju, uvođenje hidroliziranog kolagena rezultiralo je statistički značajnim povećanjem negativnog elektrostatskog naboja nanovlakana ($p < 0,01$), a što je indikator poboljšane stabilnosti disperzija u metanolnom sustavu i smanjene mogućnosti aglomeracije. Yilmaz i sur. (2022) su na nanovlaknima na bazi želatine obogaćenima eugenolom, odredili sličnu prosječnu vrijednost zeta potencijala (-15,08 mV). S druge strane, povećanje udjela zeina i proteina konoplje u binarnim polimernim sustavima s pululanom rezultiralo je suprotnim učinkom, odnosno statistički značajnim smanjenjem elektrostatskih repulzija ($p < 0,05$). Drugačiji rezultati dobiveni su u drugim istraživanjima, pri čemu su nanovlakana na bazi zeina inkapsuliranih mikroemulzija karotenoida (İnan-Çinkır i sur., 2024) te liposoma geraniola (Gholizadeh i sur., 2024) uz prisutnost lecitina, rezultirala stabilnim disperzijama, s vrijednostima zeta potencijala od -29,73 mV, odnosno -38,30 mV, a što je rezultat prisutnosti slobodnih sulfatnih skupina fosfolipida na površini nanoliposoma. Nadalje, Sun i sur. (2018) također su potvrdili pozitivan utjecaj dodatka lecitina na povećanje zeta potencijala i hidrofobnosti površine čestica unutar sustava proteina sirutke, a što je objašnjeno mogućnošću da se surfaktant vezao na proteine i

tako incirao odmatanje sekundarne konformacije proteina kroz intra- i intermolekularne elektrostatske i hidrofobne interakcije što je omogućilo površinsku dostupnost aminokiselina negativnih naboja, rezultirajući povećanjem elektrostatskih repulzija zajedno sa negativno nabijenim sulfatnim skupinama lecitina. Sukladno navedenom, moguće je da su u ispitivanim PUL:ZE te PUL:PK sustavima pozitivno nabijene aminokiseline stupile u interakciju sa sulfatnim grupama lecitina uslijed djelomičnog narušavanja sekundarne strukture proteina, tako utječući na „neutralizaciju” površinskog naboja nanovlakana odnosno smanjenje zeta potencijala.

Morfološka karakterizacija nanovlakana provedena je obzirom na promjenjivi udjel omjera pululana, hidroliziranog kolagena, zeina i proteina konoplje, ali i analizirane fizikalne i reološke parametre polimernih otopina. Formulacije PUL:KOL rezultirale su nanovlaknima pravilne, izdužene i uniformne veličine do udjela hidroliziranog kolagena od 50 %, dok je daljnje povećanje uzrokovalo narušenu strukturu, do potpunog izostanka formiranih nanovlakana, odnosno generiranja nano i mikročestica pri udjelu hidroliziranog kolagena od 70 i 80 % uslijed neprikladne viskoznosti polimernih otopina. Povećanje koncentracije polimera niske molekulske mase (hidrolizirani kolagen) smanjuje stupanj umreženosti s polimerom visoke molekulske mase (pululan), a rezultat je preniska viskoznost koja onemogućuje prevladavanje Rayleighove nestabilnosti uslijed nedostatka elastične komponente u polimernom sustavu. Pritom se formiraju kapljice polimerne otopine, tako sprječavajući formiranje Taylorovog konusa i stabilnog polimernog mlaza (Poudel i sur., 2020). S druge strane, sve formulacije PUL:ZE rezultirale su uspješno ispredenim nanovlaknima, s povećanjem prosječnog dijametra nanovlakana sukladno povećanju udjela zeina, odnosno povećanoj viskoznosti polimernih otopina. Deng i sur. (2018) također su potvrdili pozitivnu korelaciju između prividne viskoznosti i prosječnog promjera nanovlakana prilikom elektroispredanja binarnih sustava kolagena i zeina. Izgled nanovlakana nije se značajno razlikovao između formulacija, a rezultirao je unakrsno povezanim i naizmjenično prisutnim nanovlaknima u obliku vrpce, plosnate površine. Takva morfologija posljedica je kolapsa uslijed utjecaja atmosferskog tlaka prilikom trenutnog isparavanja otapala, uzrokujući eliptičnost i plosnatu površinu te savijanje nanovlakana u obliku vrpce uslijed utjecaja elektrostatske nestabilnosti (Koombhongse i sur., 2001). Slična morfologija također je uočena i u radu Wang i sur. (2019), a među ostalim, potvrđen je i značajan utjecaj vrste otapala na distribuciju dijametra, kao i povećanje viskoznosti i koncentracije zeina na poboljšanje morfologije nanovlakana, bez prisutnih čestica. Uočen je i utjecaj smanjenja konduktivnosti te povećanja udjela zeina na smanjenje dijametra nanovlakana. Nadalje, potvrđeno je poboljšanje

elektroispredivosti pululana dodatkom lecitina (10PUL+lec) u odnosu na samostalno primijenjen puulan (10PUL), a što je omogućilo stvaranje uniformnih i kontinuiranih vlakana bez mikročestica. Dodatak proteina konoplje otopini pululana nije rezultirao negativnim učinkom na morfologiju sve do udjela od 50 % (*w/w*) te su daljnjim povećanjem udjela proteina konoplje formirana nanovlakana narušene morfologije. Formulacija 50PUL:50PK pokazala je relativno uniformnu strukturu u obliku uzvojnica s plosnatom površinom te nasumičnim vretenastim deformacijama unutar strukture nanovlakana, dok je uzorak 40PUL:60PK jedini rezultirao narušenom strukturom, s diskontinuiranim, neujednačnim nanovlaknima, izraženog zavojitog oblika i prisutnim mikročesticama. Formulacija s najvećim udjelom proteina konoplje (30PUL:70PK) pokazala je vrlo gustu i umreženu strukturu s pravilnim oblikom nanovlakana u obliku vrpce, ali i mjestimično prisutnim mikročesticama. Iako su mnoga istraživanja do sada pokazala utjecaj strukture polimera te fizikalnih i reoloških svojstava otopina na morfologiju vlakana, veliki je izazov pronaći pouzdanu korelaciju ukoliko se koriste biopolimeri (Celebioglu i Uyar, 2021; Poudel i sur., 2020; Ma i sur., 2020). Za razliku od sintetskih polimera, prirodni polimeri imaju izraženu polielektrolitičku prirodu, veći udjel nečistoća i složeniju strukturu. Tako je u radovima Aceituno-Medina i sur. (2013) te Aguilar-Vázquez i sur. (2018) utvrđen negativan utjecaj dodatka proteina amaranta (70 i 80% na ukupnu masu polimera) i proteina graška (100 % udjela) na morfologiju nanovlakana, uzrokujući narušenu strukturu nanovlakana s vretenastim zadebljanjima i dominantno prisutnim mikročesticama, a kao mogućim uzrocima takve morfologije navode se: i) nepotpuno ispravanje vode, ii) globularna, kao i kompleksna tercijska i kvaterna struktura proteina te iii) sklonost formiranju agregata koji narušavaju elektroispredivost. Uspješnom elektroispređanju proteina pogoduje nasumična sekundarna struktura proteina, prisutan elastični karakter u polimernim otopinama i povoljan stupanj umreženja polimernih lanaca (Nieuwland i sur., 2013). Kritični koraci u formiranju polimernog mlaza otopine uključuju: i) prevladavanje površinske napetosti električnim nabojem polimerne kapljice te ii) neutralizaciju Rayleighove nestabilnosti odgovorne za formiranje kapljica iz polimernog mlaza (Yu i sur., 2006). Poznato je da se Rayleighov fenomen može minimizirati optimizacijom viskoelastičnih svojstava polimernih otopina, te se uz odgovarajuću površinsku napetost, ističe se i važnost elastične komponente u polimernim sustavima u neutralizaciji Rayleighovog fenomena i formiranja ujednačenih vlakana (Rutledge i Fridrikh, 2007; Ewaldz i sur., 2021). Međutim, u ovom istraživanju primjećuje se suprotan učinak povećanja udjela elastične komponente u PUL:PK binarnim otopinama, obzirom da narušena morfologija nanovlakana korelira s povećanjem udjela PK iznad 50 %, odnosno s promjenom iz viskozno u elastično ponašanje polimernih otopina.

Sličan trend utvrđen je i u radu Rošić i sur. (2012) koji su ukazali na pozitivan utjecaj povećanog faktora gubitka ($G'' > G'$) na proizvodnju nanovlakana uniformnijih i pravilnijih struktura.

Kod formulacija PUL:KOL nije detektirana promjena prosječnog promjera nanovlakana obzirom na povećanje udjela hidroliziranog kolagena i istovremeno smanjenje viskoznosti polimernih otopina. S druge strane, vidljiv je trend povećanja prosječnog promjera u odnosu na povećanje koncentracije zeina i proteina konoplje. Pozitivna korelacija između prosječnog promjera i prividne viskoznosti izostala je kod formulacija PUL:ZE ($r=0,51$), dok je za formulacije PUL:PK iznosila 0,73. Poznato je da povećanje udjela polimera veće molekulske mase te stupnja umreženosti polimernih lanaca rezultira i povećanim prosječnim promjerom nanovlakana (Xie i sur., 2016; Aguilar-Vázquez i sur., 2018). Međusobna ovisnost prividne viskoznosti, površinske napetosti, gustoće polimernih otopina i promjera kapljice, kao i njihov potencijalni sinergistički učinak na morfološke karakteristike, može se definirati bezdimenzijskim Ohnesorge-ovim brojem (Oh). Ova fizikalna veličina je kvantitativna „mjera“ viskozne komponente u otopini, a predstavlja omjer disipacije intrinzičke viskoznosti i energije površinske napetosti, a što je bitno za pravilno formiranje kapljice, stabilnog polimernog mlaza, i u konačnici, proizvodnje nanovlakana određene distribucije promjera. Kod proizvedenih nanovlakana na bazi PUL:ZE, nije utvrđena pozitivna korelacija između prosječnog promjera i Oh broja ($r=0,35$), a što slijedi trend slabe korelacije s izmjerenim vrijednostima prividne viskoznosti za iste polimerne otopine. Međutim, kod uzoraka na bazi PUL:PK utvrđen je suprotan učinak, odnosno povećanje promjera nanovlakana sukladno Oh broju ($r=0,85$). U pravilu, što je niži broj, lakše je formiranje kapljica obzirom na nižu viskoznost, tj. manje gubitke uložene energije u prevladavanje viskoznih sila. S druge strane, niske vrijednosti ovog fizikalnog parametra nisu uvijek u korelaciji s uspješnim formiranjem nanovlakana jer i drugi fizikalni i reološki parametri moraju biti uzeti u obzir (Clasen i sur., 2012). Promatrajući dobivene rezultate, sve formulacije imale su Oh vrijednosti iznad 6, a što ukazuje na prisutnost dovoljno jakih viskoznih sila za prevladavanje inercijskih učinaka i površinske napetosti otopine tijekom elektroispredanja (Seethu i sur., 2020; Clasen i sur., 2012). Ewaldz i sur. (2021) također su proučavali utjecaj fizikalnih parametara na elektroispredivost otopina na bazi PVP, PEO i PVA u metanolu i vodi, pri čemu su otopine okarakterizirane s Oh vrijednostima između 1 i 10 rezultirale uspješno proizvedenim nanovlaknima. Nadalje, dobiveni su i rezultati koji upućuju na značajnu važnost većih Oh vrijednosti u slučaju otopina niske površinske napetosti, dok je za otopine visoke površinske napetosti istaknuta važnost prisutnih elastičnih sila u otopini za formiranje nanovlakana.

5.6.4. Fizikalno-kemijska karakterizacija nosača i nanovlakana

Analiza ATR-FT-IR spektara potvrdila je prisutnost fizikalno-kemijskih interakcija između polimernih nosača i polifenolnih spojeva ekstrakta trave ive. FT-IR spektar za ekstrakt trave ive prethodno je analiziran u potpoglavlju 5.5.3.

Pululan (PUL*) je rezultirao karakterističnim apsorpcijskim trakama na 753 cm^{-1} , 846 cm^{-1} i 929 cm^{-1} , a što odgovara prisutnosti α -(1-4) glikozidnih veza između α -D-glukopiranoznih jedinica unutar ponavljajuće maltotrioze jedinice, odnosno α -(1-6)-glikozidne veze između jedinica maltotrioze (Islam i Yeum, 2013). Također, maksimumi apsorpcije pri 1077 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} i 1206 cm^{-1} pripisuju se C-O-C istezanju, dok maksimumi pri 1413 cm^{-1} , 1354 cm^{-1} i 2925 cm^{-1} impliciraju na C-H savijanje, odnosno C-H istezanje (Ma i sur., 2020). Uočena je i prisutnost OH funkcionalnih grupa podrijetlom iz formiranih vodikovih veza pri 3300 cm^{-1} (Qin i sur., 2019).

Hidrolizirani kolagen (KOL*) je rezultirao pojavom karakterističnih apsorpcijskih vrpca pri 1651 (C=O vibracije veza unutar funkcionalne skupine amida I), 1520 - 1563 cm^{-1} (savijanje N-H veze, C-N i C-C- istezanje veza unutar amida II), 1203 - 1332 cm^{-1} (veze unutar funkcionalne grupe amida III), 3067 cm^{-1} (N-H istezanje unutar amida A), 3270 cm^{-1} (N-H istezanje unutar amida B). Pomak vrpce karbonilne grupe amida I prema 1633 cm^{-1} karakterističan je za djelomično hidrolizirani i denaturirani kolagen te je pokazatelj vibracije veza unutar prolina i hidroksprolina (Kristoffersen i sur., 2023; Ficai i sur., 2013).

Izolat proteina konoplje (PK*) je rezultirao karakterističnim vibracijskim trakama za proteine: funkcionalne grupe amida I (1750 - 1600 cm^{-1}), amida II (1440 - 1580 cm^{-1}), amida III (1210 - 1420 cm^{-1}) i amida A (3200 - 3500 cm^{-1}) (Plati i sur., 2021). Dva preklapajuća maksimuma (2855 cm^{-1} i 2926 cm^{-1}) mogu biti rezultat rastezanja C-H (Rousi i sur., 2019). Apsorpcijski maksimum pri 3277 cm^{-1} može se pripisati istezanju N-H veza koje su uključene u vodikovu vezu i/ili intermolekularne veze ostvarene preko O-H funkcionalne skupine (Barth i Zscherp, 2002). Apsorpcijske vrpce detektirane pri 1064 cm^{-1} i 1172 cm^{-1} odgovaraju rastezanju C-O veze (Lan i sur. 2020).

Zein (ZE*) je također rezultirao karakterističnim apsorpcijskim vrpcama za proteine u područjima apsorpcije od 1644 - 1651 cm^{-1} , 1515 - 1530 cm^{-1} i 1238 - 1447 cm^{-1} , a koji odgovaraju funkcionalnim grupama amida I, amida II te amida III. Uzastopne vrpce manjeg intenziteta između 2872 - 2957 cm^{-1} odgovaraju C-H istezanju, dok se široka vrpca s maksimumom pri 3292 cm^{-1} pripisuje vezama unutar grupe amida A (N-H istezanje) (Deng i sur., 2018).

Suncokretov lecitin (LEC) rezultirao je s nekoliko maksimuma koji ponajprije odgovaraju esterskoj vezi između masne kiseline i glicerola (istezanje karbonilne grupe pri 1735 cm^{-1}), fosfatnim skupinama (1224 cm^{-1}) i C=C vibracijama koje potječu iz nezasićene masne kiseline (manji i djelomično spojeni maksimumi pri 1654 cm^{-1} i 1618 cm^{-1}) (Wang i sur., 2014). Nadalje, detektirana su dominantna C-H savijanja u fosfolipidnim strukturama (1459 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} i 2853 cm^{-1}). Maksimum pri 1042 cm^{-1} može se povezati s prisutnim C-O istežanjem i C-O-H savijanjem (Jurić i sur., 2021). Intenzivna apsorpcija pri 3293 cm^{-1} ukazuje na prisutnost intermolekularno vezanih O-H skupina, vjerojatno unutar strukture fosfatidilinozitola, kao dominantnog tipa fosfolipida (PL) u ukupnom sastavu lecitina. Dodatno, pomak vrpce od 3293 cm^{-1} do 3317 cm^{-1} primijećen je samo za uzorak 10PUL+lec, što je vjerojatno zbog povećane prisutnosti vodikovih veza koje se stvaraju između funkcionalnih grupa pululana, lecitina i polifenolnih spojeva u ekstraktu. Uspoređujući formulirana nanovlakna sa i bez ugrađenog polifenolnog ekstrakta, mogu se primijetiti karakteristične apsorpcijske vrpce za ekstrakt i polimere, kao i povećanje intenziteta funkcionalne grupe amida I ($1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), obzirom na povećani udjel hidroliziranog kolagena, zeina i proteina konoplje u svim uzorcima nanovlakana. Uočeno je i smanjenje intenziteta vrpce kod analiziranih nanovlakana s ekstraktom, u odnosu na nanovlakna bez ekstrakta, a što je indikator formiranih elektrostatskih, steričkih i hidrofobnih interakcija (Râpă i sur., 2021). Elektrostatske interakcije, poput npr. vodikovih, imaju ključnu ulogu u formiranju kompleksa polisaharida i proteina obzirom na veliki broj različito nabijenih funkcionalnih grupa proteina (aminokiselinski pobočni ogranci, amino i karboksilne grupe), ovisnih o pH vrijednosti, pri čemu udjel biopolimera te količina prisutnih nabijenih grupa određuje njezinu jačinu (Turgeon i sur., 2003).

Kod formulacija **PUL:KOL** obogaćenih ekstraktom trave ive, pomak maksimuma od 1027 cm^{-1} prema $1019\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ te apsorpcijskih vrpce između $1652\text{-}1531\text{ cm}^{-1}$ primijećeni su u svim formuliranim PUL:KOL nanovlaknima, a što se može pripisati tvorbi vodikovih veza, među ostalim i između hidroksilnih grupa polifenolnih spojeva iz ekstrakta te funkcionalnih polarnih grupa aminokiselina u hidroliziranom kolagenu. Huo i sur. (2021) također su detektirali smanjenje vibracija funkcionalnih skupina uključenih u tvorbu vodikovih veza obzirom na pomak prema nižem valnom broju (od 1737 cm^{-1} prema 1733 cm^{-1}) prilikom inkapsulacije artemisininina u nanovlakna na bazi polilaktične kiseline i kolagena.

Kod formulacija **PUL:ZE** i **PUL:PK** sa i bez prisutnosti ekstrakta, vidljiva je prisutnost suncokretovog lecitina (LEC) u odnosu na analizirane uzorke polimera PUL*, ZE* i PK*. Tako je kod PUL* utvrđen samo jedan maksimum pri 2928 cm^{-1} , dok su dvije apsorpcijske vrpce

između 2872-2958 cm^{-1} utvrđene kod ZE*, 2854-2927 cm^{-1} kod PK* te 2922-2853 cm^{-1} kod LEC. Pomak detektiranih maksimuma kod svih nanovlakana od 2931 cm^{-1} prema 2855 cm^{-1} , kao i onih između 1238-1243 cm^{-1} u odnosu na LEC, vjerojatno je rezultat interakcija između polimera i LEC, a što je potvrda uloge suncokretovog lecitina kao stabilizatora između hidrofilnog pululana te relativno hidrofobne strukture zeina, odnosno izolata proteina konoplje, a što je omogućilo formuliranje homogenih binarnih suspenzija. Sukladno navedenom, interakcije između funkcionalnih skupina polifenolnog ekstrakta trave ive, pululana, proteina konoplje, zeina i lecitina u nanovlaknima istražene su u kontekstu FT-IR spektra lecitina. Poznato je da polarne grupe surfaktanata stupaju u interakcije s nabijenim aminokiselinskim grupama proteina, dok istovremeno mogu formirati i hidrofobne interakcije preko alkilnog lanca (Xia i sur., 2018). Kod formulacija **PUL:ZE** obogaćenih ekstraktom trave ive, pomaci maksimuma apsorpcijskih vrpce od 1027 cm^{-1} prema 1012-1022 cm^{-1} , te pomaci od 1735 do 1535 cm^{-1} , upućuju na ostvarene elektrostatske interakcije između funkcionalnih grupa polifenolnih spojeva ekstrakta, polimera i lecitina. Zein primarno ostvaruje vodikove interakcije s hidroksilnim skupinama polisaharida preko glutamina (Escamilla-Garcia i sur., 2013), dok s polifenolnim spojevima dodatno stvara i hidrofobne interakcije ovisno o njihovoj polarnosti. Chen i sur. (2018) tako su utvrdili utjecaj hidrofobnih, elektrostatskih i vodikovih veza u formiranju kompleksa hijaluronske kiseline i kvercetagetina sa zeinom. FT-IR analiza nanočestica inkapsuliranog kurkumina primjenom zeina i lecitina ukazala je na interakciju hidrofobnog kurkumina sa zeinom i lecitinom putem vodikovih (uključene karbonilne i hidroksilne grupe) i hidrofobnih (uključene C-C-C i C-O-C veze unutar aromatskih prstena te alkilni lanci lecitina) interakcija (Dai i sur., 2017). Kod formulacija **PUL:PK** obogaćenih ekstraktom trave ive, pomaci maksimuma pri 1224 cm^{-1} prema 1238 cm^{-1} i 1042 cm^{-1} prema 1015 cm^{-1} primijećeni su u svim formulacijama, a što se može pripisati formiranim vodikovim vezama između polarnih fosfatnih skupina i glicerola u lecitinu, hidroksilnih skupina polarnih feniletanoidnih glikozida i funkcionalnih polarnih skupina proteina. Višestruki pomaci maksimalnih vrijednosti apsorpcije u rasponu između 1600-1300 cm^{-1} mogu ukazivati na pojačane vodikove veze između karbonilnih, amino i hidroksilnih grupa te hidrofobne interakcije između lanaca masnih kiselina u lecitinu i aromatskih struktura aminokiselina proteina konoplje te polifenolnih spojeva u ekstraktu. U usporedbi s lecitinom, primijećeno je smanjenje intenziteta vrpce pri 1735 cm^{-1} , a što može biti rezultat formirane vodikove veze s hidroksilnim skupinama polifenola i karbonilnim te amino skupinama PK (Dai i sur., 2017). Aguilar-Vázquez i sur. (2018) također su utvrdili prisutnost interakcija između hidroksilnih grupa pululana i amino grupa proteina graška u prisutnosti neionskog surfaktanta Tween 90.

Analiza cirkularnog dikroizma (CD) nanovlakana s inkorporiranim ekstraktom trave ive potvrdila je utjecaj polifenolnog ekstrakta na promjenu sekundarne konformacije proteina, u odnosu na nanovlakna bez ekstrakta. Kod svih uzoraka bez ekstrakta na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, može se uočiti po jedan negativni maksimum oko 198 nm, inače karakterističan za nasumičnu sekundarnu strukturu uzvojnice. Nije uočen pozitivan maksimum pri 220 nm kao indikator prisutnosti trostruke uzvojnice, tipične za kolagen, a što je posljedica hidrolize na manje (poli)peptide. Rezultati su u skladu s FT-IR analizom spektara, odnosno s maksimumom apsorpcijske vrpce od 1633 cm^{-1} koja se inače povezuje s denaturacijom proteina te smanjenim intenzitetom vrpce pri 1660 cm^{-1} , kao indikatorom strukture trostruke uzvojnice (Dānilā i sur., 2021). Kod svih PUL:ZE formulacija, na spektrima se primjećuju dva negativna maksimuma; jedan intenzivniji između 204-206 nm koji upućuje na nasumičnu uzvojnica te jedan širi i manje izražen između 218-224 nm. Konkretno, apsorpcijski maksimum pri 222 nm kod formulacija 70PUL:30ZE, 40PUL:60ZE i 30PUL:70ZE upućuje na prisutnost α -heliks konformacije (Liu i sur.2021), dok je kod 50PUL:50ZE i 20PUL:80ZE prisutna β -ploča unutar strukture (218-220 nm) (Chen i sur., 2020). Kod svih PUL:PK formulacija, mogu se uočiti dva negativna maksimuma: pri 204 nm i između 216-218 nm, a što upućuje na prisutnost nasumičnih uzvojnica u sekundarnoj strukturi, odnosno β -ploču (Karabulut i sur., 2022; Kutzli i sur., 2023). Osim toga, formulacije 70PUL:30PK, 50PUL:50PK, 40PUL:60PK i 30PUL:70PK pokazale su i prisutnost α -heliksa (manji negativni maksimum oko 222 nm). Nanovlakna s polifenolnim ekstraktom trave ive kod PUL:KOL_E, PUL:ZE_E te PUL:PK_E rezultirala su vrlo sličnim spektrima u odnosu na nanovlakna bez ekstrakta, no s manjim pomacima kod detektiranih maksimuma te promjeni intenziteta elipitičnosti. Ovisno o uzroku, ove promjene ukazuju na smanjenje ili povećanje udjela nasumičnih zavojnica i time otvorenije, interaktivnije strukture proteina, odnosno α -heliks uzvojnice i β -ploče za stabilniju i zatvoreniju proteinsku konformaciju. Jedino je kod uzoraka 30PUL:70KOL_E, 30PUL:70ZE_E, 20PUL:80ZE_E te 40PUL:60PK_E uočeno preklapanje spektara s pripadajućim uzorcima nanovlakana bez ekstrakta, a što ukazuje na nepromijenjenu sekundarnu konformaciju strukture proteina.

U prethodnom dijelu rasprave vezane za karakterizaciju inkapsulata ATR-FT-IR analizom, spomenuta je priroda interakcija proteina i polifenola. Radi se o pretežito nekovalentnom tipu interakcija, a uključuje hidrofobne interakcije i elektrostatske interakcije poput vodikovih veza. One značajno ovise o karakteristikama proteina (konformacija, stereospecifičnost veznih mjesta, funkcionalne grupe pobočnih aminokiselina) i polifenolnih spojeva (molekularna masa, stupanj polimerizacije, konformacijska fleksibilnost itd.) (Naczki i sur., 2006; Yuksel i sur., 2010). Ekstrakt trave ive bogat je feniletanoidnim glikozidima koji se

sastoje od aromatskih struktura (kafeinska kiselina i hidroksitirosol) i polarnih šećernih jedinica, a što omogućuje formiranje hidrofobnih interakcija i vodikovih veza unutar sustava pululan/protein konoplje/lecitin te pululan/zein/lecitin. U prisutnosti lecitina, pululan sa svojim hidroksilnim, ionizirajućim skupinama dodatno može stabilizirati hidrofobne proteine i ostvarivati interakcije sa šećernim jedinicama feniletanoidnih glikozida, dok istovremeno proteini mogu stupati u interakcije s alkilnim lancima te fosfatnom grupom fosfolipida, a preko polarnijih aminokiselinskih pobočnih ogranaka i s polifenolima. Promjena sekundarne konformacije uslijed interakcija polifenolnih spojeva i proteina, odnosno povećanje udjela α -heliksa u odnosu na nasumičnu zavojnica prilikom interakcije sojinih proteina i polifenola čaja, utvrđena je i u radu Ge i sur. (2021). Prilikom inkapsulacije kurkumina u nanočestice zeina, također je zadržana uređena i stabilna sekundarna konformacija (Chen i sur, 2020), dok je u radu Liu i sur. (2017) prilikom formuliranja konjugata kvercetagetina i zeina utvrđen povećan udio otvorenije, manje stabilne strukture zeina (povećanje udjela nasumične zavojnice). Slične rezultate dobili su Zhao i sur. (2020) prilikom istraživanja interakcija između galne i taninske kiseline te kazeina, odnosno kolagena, utvrdivši učinak narušavanja uređene sekundarne konformacije.

5.6.5. Toplinska svojstva nosača i nanovlakana

Toplinske analize polimernih nosača za inkapsulaciju neophodne su za utvrđivanje mogućih endotermnih (ispravanje, taljenje) ili egzotermnih (kristalizacija) promjena u određenom temperaturnom rasponu, a što je vrlo važno za procjenu mogućnosti njihovog korištenja u matriksima koji se podvrgavaju određenim toplinskim tretmanima. U svrhu određivanja utjecaja prisutnosti polifenolnog ekstrakta na toplinska svojstva korištenih polimera, primijenjena je DSC tehnika. Prema dobivenim termogramima, ispitivani polimeri (PUL, KOL, ZE i PK) nisu rezultirali prisutnim faznim prijelazima, a nije zabilježena niti temperatura staklastog prijelaza. Isto je primijećeno i za sve formulacije nanovlakana, sa i bez ekstrakta, a što ukazuje na zadržanu stabilnost unutar primijenjenog temperaturnog režima, bez utjecaja ekstrakta na iniciranje toplinskih faznih promjena. Endotermni pikovi između 56-75 °C za sva nanovlakna bez ekstrakta (26,83-123,52 J g⁻¹) i nanovlakna obogaćena ekstraktom (5,95-99,66 J g⁻¹), osim kod lecitina i proteina konoplje, povezani su s isparavanjem vode iz uzoraka (Singh i sur., 2019; Singh i sur., 2021). Shao i sur. (2018) također nisu uočili značajnije promjene termalnih svojstava pululana i karboksimetil celuloze u prisutnosti polifenolnog ekstrakta iz *Camellie sinensis*, dok su Li i sur. (2021) utvrdili pozitivan učinak eugenola na

povećanje temperature staklastog prijelaza želatine kao polimernog nosača za inkapsulaciju. Ispitivanja faznih promjena DSC tehnikom vrlo često se koriste prilikom kemijskih modifikacija polimera u cilju detekcije povećanja ili smanjenja faznih promjena od interesa. Tako su, primjerice, Ren i sur. (2022) uspješno dokazali poboljšanu termalnu stabilnost kovalentnih konjugata zeina i rezveratrola kao inovativnih inkapsuliranih sustava poboljšanih tehnoloških svojstava.

5.6.6. *Bioaktivna svojstva nanovlakana*

Obzirom na samostalno korišten pululan, vidljiv je utjecaj povećanja njegovog udjela na povećanje *inkapsulacijske učinkovitosti* (IU), kao i uvođenje fosfolipidne komponente u polimerni sustav. Sve PUL:KOL formulacije rezultirale su zadovoljavajućim zadržavanjem analiziranog TPC-a (IU: > 70 %), odnosno pojedinačnih polifenolnih spojeva (IU: > 72 %). Polimerni sustavi PUL:PK pokazali su bolji potencijal u zadržavanju TPC-a (> 89 %) te pojedinačnih feniletanoidnih glikozida (> 80 %) u odnosu na sustave PUL:ZE (TPC: > 73 %, feniletanoidni glikozidi: > 76 %). Iako trenutno nisu dostupna istraživanja vezana za primjenu elektroispredanja feniletanoidnih glikozida, najnovije studije uglavnom su koristile druge nanosustave za njihovu inkapsulaciju. Li i sur. (2016) tako su inkapsulirali koncentrat feniletanoidnih glikozida iz *Cistanche* spp. u formi liposoma korištenjem fosfolipida soje, poloksamera 188 i natrijevog deoksikolata, a koji su rezultirali niskom inkapsulacijskom učinkovitošću (26,58-53,90 %). S druge strane, Wu i sur. (2023) formulirali su visokoučinkovite lipidne nanokapsule verbaskozida tehnikom reverznih micela s rezultirajućom IU od 85 % te produljenom stabilnošću tijekom šest mjeseci pri 4 °C. Visoka IU može se pripisati i ostvarenim elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama između polimernih nosača i polifenolnih spojeva ekstrakta, prethodno objašnjenima u potpoglavlju 5.6.4.

Rezultati *kinetike otpuštanja polifenola* u simuliranim *in vitro* uvjetima probave upućuju na značajan potencijal sustava PUL:ZE, odnosno PUL:PK u zadržavanju polifenolnih spojeva s naglaskom na feniletanoidne glikozide, omogućujući tako njihovo kontrolirano otpuštanje, dok su formulacije na bazi pululana i hidroliziranog kolagena rezultirale trenutnim, nekontroliranim otpuštanjem TPC-a. Uvođenje fosfolipidne komponente u polisaharidnu otopinu (10PUL+lec) poboljšalo je strukturni integritet dozirnog sustava i omogućilo formiranje elektrostatskih i hidrofobnih interakcija između funkcionalnih grupa pululana, lecitina i polifenola ekstrakta trave ive, tako usporavajući kinetiku otpuštanja spojeva od interesa. Premda hidrofилni sustavi pululana i hidroliziranog kolagena nisu omogućili postepeno

otpuštanje polifenolnih spojeva ekstrakta trave ive iz formuliranih nanovlakana, ovi binarni polimerni sustavi pokazuju potencijal za razvoj trenutačno topivih dozirnih sustava (eng. *fast dissolving systems*) bioaktivnih komponenti različitih polarnosti. Rezaeina i sur. (2024) razvili su nanovlakna na bazi binarnih polimernih blendova kolagena i β -ciklodekstrina s inkorporiranim mentolom poboljšane topljivosti u oralnoj fazi i produljenog otpuštanja arome u simuliranom *in vitro* sustavu. S druge strane, dosadašnja istraživanja također upućuju na niz prednosti prilikom kombiniranja proteina hidrofobnog profila s hidrofilnim polisaharidima poput ksantana, arapske gume i pululana u poboljšanju fizikalno-kemijskih svojstava i produljenog otpuštanja kurkumina, polifenolnih spojeva iz ekstrakta *Ruta chalepensis*, odnosno silimina kao aktivne komponente silimarina iz nanosustava (Zhang i sur., 2021; Gali i sur., 2022; Lu i sur., 2022). Uvođenjem polisaharida s ionizirajućim grupama u otopinu zeina, formiraju se poželjne elektrostatske interakcije koje stabiliziraju komplekse te umanjuju agregaciju i precipitaciju zeina u polarnom okruženju uslijed izraženog hidrofobnog karaktera, stabilizirajući tako nanosustave u širem pH rasponu, uz poboljšanje inkapsulacijske učinkovitosti i modifikaciju kinetike otpuštanja aktivnih komponenti (Li i sur., 2019).

5.7. Formulacija funkcionalnih bombonskih proizvoda

5.7.1. Bioaktivna karakterizacija

Jedan od glavnih izazova prilikom razvoja obogaćenih funkcionalnih proizvoda bioaktivnim spojevima, poput polifenola, predstavlja njihova stvarna količina koja se može inkorporirati u matriks hrane u cilju postizanja značajnog obogaćivanja i istovremenog očuvanja teksturalnih i senzorskih svojstava prehrambenog proizvoda. U mnogim istraživanjima uspješno su implementirani različiti izvori bioaktivnih spojeva u obliku ekstrakata ili inkapsuliranih sustava u gumene ili žele bombone, poput ekstrakta nusproizvoda kadulje (Cedeño-Pinos i sur., 2023), ekstrakta ružmarina (Cedeño-Pinos i sur., 2020), mikrokapsula na bazi ekstrakta hibiskusa (de Mouraa i sur., 2023) i ekstrakta lamduana (Sakulnarmrat i Konczak, 2023), a koja su rezultirala obogaćivanjem modela hrane s 30-38 mg GAE 100 g⁻¹ (TPC), 197-411 μg GAE g⁻¹ (TPC), 1,99 mg GAE 100 g⁻¹ (TPC), odnosno 1,4 mg ekv. cijanidin-3-glukozida g⁻¹ s tv. (ukupni sadržaj antocijana). Usporedbom bioaktivnog potencijala konačnog proizvoda s prethodnim istraživanjima, u ovom radu postignuto je puno veće (otprilike 10 puta) obogaćivanje, uzimajući u obzir rezultate udjela pojedinačnih feniletanoidnih glikozida.

5.7.2. *Teksturalna svojstva*

Prema rezultatima instrumentalnog TPA testa, većina izmjerenih teksturalnih svojstava formuliranih žele proizvoda nisu bila statistički značajno različita, neovisno o omjerima korištenog kukuruznog i kudzu škroba ($p > 0,05$). Obzirom na tvrdoću, uočene su statistički značajno niže vrijednosti za 100_KŠ (794,94 g) u odnosu na uzorak 100_KZ (978,94 g) ($p < 0,05$). Postoji limitirani broj istraživanja baziranih na analizi utjecaja vrste škroba na teksturu, poput kudzu-a ili komercijalnih pasta i gelova na bazi kukuruznog škroba. Međutim, neki radovi pokazuju pozitivnu korelaciju između sadržaja amiloze i tvrdoće u formiranim gel sustavima (Lu i sur., 2013; Kohyama i sur., 2016). Kada se suspendiraju u vodi i zagrijavaju, granule škroba podvrgnute su hidrataciji, bubrenju i dezintegraciji strukture u pastu, uslijed otapanja kristalnih struktura amiloze i prelaska u okolni medij. Tijekom hlađenja, struktura gela nastaje procesom retrogradacije, kao posljedice reasocijacije amiloze preko vodikovih veza u kristalnu strukturu, zajedno s dispergiranim molekulama amilopektina. U početnoj fazi retrogradacije, ukupan sadržaj amiloze uvelike utječe na tvrdoću gela. Što je više amiloze u pasti tijekom procesa želatinizacije, to će biti više obnovljenih kristalnih struktura udruženih s lancima amilopektina, sa tvrdom strukturom kao krajnjim rezultatom. Budući da je kudzu škrob karakteriziran statistički značajno ($p < 0,05$) manjim udjelom amiloze (18,50 %) od komercijalnog kukuruznog škroba (21,48 %) u ovom radu ($p < 0,05$), ne može se uočiti pozitivna korelacija između tvrdoće formuliranog žele proizvoda i udjela amiloze. Razlog je vjerojatno nedovoljna osjetljivost instrumenta na relativno malu, ali brojčano značajnu razliku između kvantificirane amiloze u analiziranim škrobovima.

5.7.3. *Kinetika otpuštanja polifenola u in vitro uvjetima*

Prema usporedbi rezultata *in vitro* digestije žele proizvoda obogaćenog inkapsuliranim i liofiliziranim ekstraktom trave ive, vidljivo je da su alkalni uvjeti i aktivnost enzima humane amilaze u oralnom bolusu utjecali na ubrzano otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina (HC) iz punjenja kontrolnog uzorka (s liofiliziranim ekstraktom), dok je udio ukupnih HC bio manji kod uzorka s inkapsuliranim ekstraktom nakon oralne faze. Iako su mnoga istraživanja ukazala na manji utjecaj uvjeta oralne faze na bioraspoloživost npr. HC i/ili flavonoidnih glikozida (Thumann i sur., 2020; Sun i sur., 2021), u nekima je ipak uočena postepena degradacija, primjerice, kaempferol glikozida iz korijena biljke Sanyeqing (Takahama i Hirota, 2013), flavonola i flavona iz ekstrakta biljne vrste *Diplotaxis harra* (Bahloul i sur., 2016),

izmjerenih ukupnih HC, flavana i flavona iz kore i pulpe jabuke (Kaeswurm i sur., 2022) itd. Na stupanj bioraspoloživosti značajno utječe kemijski sastav uzroka, kemijska struktura spojeva od interesa (npr. prisutnost esterskih ili glikozidnih veza) te interakcija između makrokomponenti prehrambenog matriksa i proučavanih spojeva. Daljnji trend otpuštanja polifenola u obje faze, želučanoj i intestinalnoj, opažen je za kontrolni uzorak, uz očuvanje ~50 % ukupnih HC na kraju simulirane probave (od 1,54 mg g⁻¹ do 0,81 mg po porciji proizvoda). S druge strane, prolongirano otpuštanje polifenola iz inkapsulata unutar punjenja žele proizvoda postignuto je tijekom cjelokupne gastrointestinalne probave. Iako je degradacija škrobnog matriksa započela već u oralnoj fazi, razlaganje lipida i masti uslijed prisutnosti žučnih soli u intestinalnoj fazi ubrzala je proces otpuštanja ukupnih HC iz čokoladnog punjenja nakon 135 minuta (Hiolle i sur., 2019). Iz navedenog se može zaključiti da je inkorporacija inkapsuliranih mikročestica na bazi karboksimetil celuloze u čokoladno punjenje relativno hidrofobnog karaktera pridonijelo zaštiti ekstrakta unutar inkapsuliranog sustava od hidrofilnih uvjeta simulirane probave, te posljedično, omogućilo sporije oslobađanje polifenolnih spojeva iz promatranog prehrambenog matriksa.

5.7.4. *Senzorska svojstva*

Senzorska evaluacija je i dalje nezamjenjiva analiza za definiranje najpoželjnijih senzorskih karakteristika prilikom razvoja novog ili izmijenjenog prehrambenog proizvoda. Uzorak 75KŠ_25KZ pokazao se najpoželjnijom formulacijom prema ocjenama opće prihvatljivosti i ocijenjen je najvećim intenzitetom za konzistenciju, i najmanjima za naknadni okus i gorčinu. S druge strane, intenzitet gorčine i naknadni okus, kao nepoželjni senzorski atributi u kontekstu žele bombonskih proizvoda obogaćenima biljnim ekstraktima, bili su najizraženiji kod uzoraka 100KŠ i 100KZ. Može se uočiti pozitivan trend između senzorski ocijenjene žvakljivosti i instrumentalno određene elastičnosti ($r=0,61$), odnosno kohezivnosti ($r=0,76$). Takvi rezultati su očekivani obzirom da je karakteristika žvakljivosti, definirana kao ukupna energija potrebna za dezintegraciju strukture prehrambenog matriksa u ustima, derivirana iz umnoška tvrdoće, kohezivnošću i elastičnošću. Senzorski ocijenjena tvrdoća slabo je korelirala s instrumentalno određenom kohezivnosti ($r=0,47$) i elastičnosti ($r=0,45$). S druge strane, primijećena je visoka korelacija senzorski ocijenjene tvrdoće i žvakljivosti ($r=0,89$), a koja se može objasniti postojanjem niskog senzorskog praga osjetljivosti u razlikovanju tvrdoće i žvakljivosti za proizvode izražene mekane konzistencije.

6. ZAKLJUČCI

1. Svi uzorci trave ive, prikupljeni sa šest različitih lokaliteta na području Primorske Hrvatske, rezultirali su podjednakim udjelom netopljivih vlakana kao najzastupljenije makrokomponente (54-58 %), vrlo niskim udjelom lipidne frakcije (1,4-3,0 %), a u pogledu mineralnog sastava, prisutnim udjelima istaknuli se se kalcij i kalij.

2. U travi ivi identificirano je 9 feniletanoidnih glikozida i 3 flavonoida, dok su po prvi put detektirani β -OH-forzitozid B, jionozid A, teupoliozid i stahizozid A. Od svih kvantificiranih feniletanoidnih glikozida (30,36-68,06 mg g⁻¹ s. tv.), ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid određeni su kao najzastupljeniji polifenolni spojevi.

3. *In vitro* ispitivanjima na humanim staničnim linijama probavnog sustava (CAL27, Caco-2, AGS, HepG2) pri koncentracijama ekstrakta od 0,025, 0,050, 0,150 i 0,500 mg mL⁻¹, utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$), o koncentraciji ovisan antioksidacijski učinak na svim testiranim staničnim linijama (0,050 i 0,500 mg mL⁻¹), dok je tretman pri 0,500 mg mL⁻¹ rezultirao genoprotektivnim učinkom na modelnom DNK plazmidu ($p < 0,05$).

4. Na *in vivo* modelu štakora pri koncentracijama ekstrakta od 250, 500 i 1000 mg kg⁻¹, utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$) antioksidacijski učinak ekstrakta na jetru neovisno o spolu, vidljiv kao smanjenje udjela generiranih karboniliranih proteina i povećanje udjela ukupnog glutaciona te statistički značajan ($p < 0,05$) zaštitni učinak ekstrakta smanjenja oksidacijskog oštećenja genetičkog materijala stanica krvi.

5. Od 13 formulacija inkapsuliranih dozirnih sustava ekstrakta dobivenih sušenjem raspršivanjem, mikročestice na bazi arapske i djelomično hidrolizirane guar gume rezultirale su najučinkovitijim prinosom i inkapsulacijskom učinkovitošću (> 74 %), dok je uvođenje karboksimetil celuloze kao baznog polimernog nosača relativno hidrofobnog karaktera, značajno usporilo kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva ekstrakta iz dozirnih sustava u simuliranim uvjetima probave.

6. Od 23 formulacije inkapsuliranih dozirnih sustava ekstrakta dobivenih elektroispredanjem, njih 20 je rezultiralo uspješno proizvedenim nanovlaknima visoke inkapsulacijske učinkovitosti (> 72 %), dok su polimerni sustavi pululana i zeina te pululana i proteina konoplje rezultirali najpoželjnijim profilom otpuštanja polifenolnih spojeva ekstrakta iz inkapsuliranih dozirnih sustava u simuliranim uvjetima probave, uz nastavak prolongiranog otpuštanja u intestinalnoj fazi.

7. Model punjenog žele proizvoda na bazi škroba pokazao se prikladnim za inkorporiranje inkapsuliranog dozirnog sustava ekstrakta trave ive, rezultirajući značajnim obogaćenjem bioaktivnog sastava feniletanoidnim glikozidima ($1,2 \text{ mg g}^{-1}$), prikladnim senzorskim i teksturalnim karakteristikama i poželjnom kinetikom oslobađanja polifenolnih spojeva iz dozirnog sustava.

7. LITERATURA

Abd Razak, S.I., Wahab, I.F., Fadil, F., Dahli, F.N., Md Khudzari, A.Z., Adeli, H. (2015) A review of electrospun conductive polyaniline based nanofiber composites and blends: processing features, applications, and future directions. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2015**, 356286.

Abdul Hameed, M.M., Mohamed Khan, S.A.P., Thamer, B.M., Rajkumar, N., El-Hamshary, H., El-Newehy, M. (2023) Electrospun nanofibers for drug delivery applications: Methods and mechanism. *Polym. Advan. Technol.* **34**, 6-23.

Abdullah, N. A., Ahmad Sekak, K., Ahmad, M. R. (2016) Effect of molecular weight on morphological structure of electrospun PVA nanofibre. *Adv. Mater. Res.* **1134**, 203-208.

Abinaya, K., Sharmila, K., Priya, S., Ponmozhi, M., Linekha, R. (2023) Valorization of surplus onion for the development and characterization of antioxidant-rich gummies. *Food Hydrocoll. Hlth.* **3**, 100130.

Aboelsoud, N.H. (2010) Herbal medicine in ancient Egypt. *J. Med. Plants Res.* **4**, 82–86.

Abuarra, A., Hashim, R., Bauk, S., Kandaiya, S., Tousi, E.T. (2014) Fabrication and characterization of gum Arabic bonded *Rhizophora* spp. particleboards. *Mater Des.* **60**, 108–115.

Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Lagaron, J.M., López-Rubio, A. (2013) Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Res. Int.* **54**, 667-674.

Acevedo, J.A., Castañeda, C.M.C., Benitez, F.J.C., Durán, D.A., Barroso, V.R., Martínez, C.G., Muñoz, L.J.L., Martínez, C.A., de Vivar, A.R. (2005) Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* **76**, 301-309.

Aćimović, M., Stanković Jeremić, J., Miljković, A., Rat, M., Lončar, B. (2023) Screening of volatile compounds, traditional and modern phytotherapy approaches of selected non-aromatic medicinal plants (Lamiaceae, *Lamioideae*) from Rtanj mountain, Eastern Serbia. *Molecules* **28**, 4611.

Adams, M., Berset, C., Kessler, M., Hamburger, M. (2009) Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders – a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol.* **121**, 343–359.

Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B.R., Troung, V. (2004) Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *J. Food Eng.* **62**, 53-68.

Agampodi, V.A., Katavic, P., Collet, C., Collet, T. (2022) Antibacterial and anti-inflammatory activity of extracts and major constituents derived from *Stachytarpheta indica* Linn. leaves and their potential implications for wound healing. *Appl. Biochem. Biotech.* **194**, 6213-6254.

Agar, O.T., Cankaya, I.I.T. (2020) Analysis of phenylethanoids and their glycosidic derivatives. U: *Recent advances in natural products analysis* (Silva, A.S., Nabavi, S.F., Saeedi, M., Nabavi, S.M., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 221-254.

- Aguilar-Vázquez, G., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J.D., Mendoza, S. (2018) Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocolloid*. **83**, 173-181.
- Ahmad, N., Anwar, S., Fazal, H., Abbasi, B.H. (2013) Medicinal plants used in indigenous therapy by people of Madyan Valley in district Swat, Pakistan. *Int. J. Med. Arom. Plants* **3**, 47–54.
- Ahmed, G.H.G., Fernández-González, A., García, M.E.D. (2020) Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nanoemulsification. *Food Hydrocolloid*. **108**, 105806.
- Ahmed, J., Thomas, L. (2018) Effect of xanthan and guar gum on the pasting, stickiness and extensional properties of brown wheat flour/ β -glucan composite doughs. *LWT-Food Sci. Technol.* **87**, 443-449.
- Ahn, S.Y., Jo, M. S., Lee, D., Baek, S.E., Baek, J., Yu, J.S., Jo, J., Yun, H., Kang, K.S., Yoo, J.E., Kim, K.H. (2019) Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Bioorg. Chem.* **83**, 135-144.
- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., Suyama, K. (2006) New method for the quantitative determination of major protein carbonyls, α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes: investigation of the formation mechanism and chemical nature *in vitro* and *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1059-1065.
- Akgul, A., Akgul, A., Senol, S.G., Yildirim, H., Secmen, O., Dogan, Y. (2018) An ethnobotanical study in Midyat (Turkey), a city on the silk road where cultures meet. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **14**, 12.
- Alam, M.R., Alimuzzaman, S., Shahid, M.A., Fahmida-E-Karim, Hoque, M.E. (2023) collagen/*Nigella sativa*/chitosan inscribed electrospun hybrid bio-nanocomposites for skin tissue engineering. *J. Biomat. Sci. – Polym. E* **34**, 1517-1538.
- Alba, K., Kontogiorgos, V. (2018) Seaweed polysaccharides (agar, alginate carrageenan). U: *Encyclopedia of Food Chemistry* (Meton, L., Shahidi, F., Varelis, P, ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 240-250.
- Alghazeer, R., Elgahmasi, S., Abdullah, E., Ahtiweh, O., Althaluti, E., Shamlan, G., Alansari, A., Eskandrani, A.A. (2021) Elucidation of nutritional, phytochemical and pharmacological activities of *Teucrium Polium* grown in Libya. *J. Anim. Plant Sci.* **31**, 1439-1452.
- Allen, D. E., Hatfield, G. (2004) St John's-worts to Primulas. U: *Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britain & Ireland*. Timber Press Inc., Portland, str. 115.
- Altundag E., Ozturk, M. (2011) Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc. Behav. Sci.* **19**, 756–777.
- Altuntuğ Cesur, M. İ., Osman, B., Tümay Özer, E., Kanmaz, D., Baykara, M., Karaca, E. (2024) Preparation and characterization of latanoprost-loaded PVA nanofibers as an ocular drug delivery system for glaucoma treatment. *Int. J. Polym. Mater. Po.* **73**, 761-770.

Alves, A.I., Rodrigues, M.Z., Pinto, M.R.M.R., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., Perrone, Í.T., Ramos, A.M. (2017) Morphological characterization of pequi extract microencapsulated through spray drying. *Int. J. Food Prop.* **20**, 1298–1305.

Amoako, D., Awika, J.M. (2016) Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 14–18.

Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P.S. (2015) Introduction to spray drying. U: *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation* (Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P. S., ured.), John Wiley & Sons., New Jersey, str. 1-33.

Andary, C., Wylde, R., Heitz, A., Rascol, J., Roussel, J.L., Laffite, C. (1985) Poliumoside, a caffeic glycoside ester from *Teucrium belion*. *Phytochemistry* **24**, 362–364.

Andary, C., Wylde, R., Laffite, C., Privat, G., Winternitz, F. (1982) Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche Rapum*-Genistae. *Phytochemistry* **21**, 11232–11237.

Anderson, T.J., Lamsal, B.P. (2011) Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review. *Cereal Chem.* **88**, 159–173.

Andrady, A. L. (2008) Factors affecting nanofiber quality. U: *Science and technology of polymer nanofibers* (Andrady, A.L., ured.). Wiley, New Jersey, str. 81-110.

Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Anjum, M.N., Aftab, W. (2021) Preparation and characterization of guar gum based polyurethanes. *Int. J. Biol. Macromol.* **183**, 2174–2183.

Anonymus (2024a) Functional Food Ingredients Market by Type (Probiotics, Protein & Amino Acids, Phytochemicals & Plant Extracts, Prebiotics, Omega-3-Fatty Acids, Carotenoids, Vitamins) Application, Source, Form, Health Benefits and Region-Global Forecast to 2029. <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/functional-food-ingredients-market-9242020.html>> Pristupljeno 18. lipnja 2024.

Anonymus (2024b) Spray drying. Büchi, <<https://www.buchi.com/en/spray-drying>>. Pristupljeno 1. svibnja 2024.

Anonymus (2024c) Functional food market size is projected to reach USD 347231 million by 2031, growing at a CAGR of 6.84%: straits research, <<https://www.globenewswire.com/news-release/2024/03/28/2854263/0/en/Functional-Food-Market-Size-is-projected-to-reach-USD-347231-million-by-2031-growing-at-a-CAGR-of-6-8>> Pristupljeno 5. svibnja 2024.

Anonymus (2024d) Jellies & gummies global market report. 2024, <<https://www.researchandmarkets.com/reports/5744192/jellies-and-gummies-global-market-report>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.

Anonymus (2024e) NATRISE botanicals, <<https://www.abres.it/en/nutraceutic/botanicals/>>. Pristupljeno 17. svibnja 2024.

Ansari, M.T., Sunderland, V.B. (2008) Solid dispersions of dihydroartemisinin in polyvinylpyrrolidone. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 390-398.

Arancibia, C., Bayarri, S., Costell, E. (2013) Comparing carboxymethyl cellulose and starch as thickeners in oil/water emulsions. implications on rheological and structural properties. *Food Biophys.* **8**, 122-136.

- Archaina, D., Sosa, N., Rivero, R., Schebor, C. (2019) Freeze-dried candies from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and yoghurt. Physicochemical and sensorial characterization. *LWT-Food Sci. Technol.* **100**, 444–449.
- Ari, S., Temel, M., Kargioğlu, M., Konuk, M. (2015) Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar – Turkey. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **11**, 1-15.
- Arnold, N. (1985) Contribution á la connaissance ethnobotanique et médicinale de la fore de Chypre, 3. izd., Université Renè Descartes de Paris, Paris, str. 1203–1210.
- Arthur, H., Joubert, E., De Beer, D., Malherbe, C.J., Witthuhn, R.C. (2011) Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurisation of plant material. *Food Chem.* **127**, 581-588.
- Atanasova, A., Petrova, A., Teneva, D., Ognyanov, M., Georgiev, Y., Nenov, N., Denev, P. (2023) Subcritical water extraction of rosmarinic acid from Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) and its effect on plant cell wall constituents. *Antioxidants* **12**, 888.
- Attama, A.A., Schicke, B.C., Paepenmüller, T., Müller-Goymann, C.C. (2007) Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**(1), 48-57.
- Attia, Y.M., El-Kersh, D.M., Wagdy, H.A., Elmazar, M.M. (2018) Verbascoside: Identification, quantification, and potential sensitization of colorectal cancer cells to 5-FU by targeting PI3K/AKT pathway. *Sci. Rep.* **8**, 16939.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014.
- Ayar, E.N., Nyambe, C., Hashim, M.A., Altin-Yavuzarslan, G., El-Messery, T.M., Özçelik, B. (2024) Optimizing encapsulation of black carrot extract using complex coacervation technique: Maximizing the bioaccessibility and release kinetics in different food matrixes. *LWT-Food Sci. Technol.* **198**, 115995.
- Aydogdu, A., G. Sumnu, S., Sahin, A. (2017) A novel electrospun hydroxypropyl methylcellulose/polyethylene oxide blend nanofibers: Morphology and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **181**, 234 -246.
- Babich, H., Schuck, A.G., Weisburg, J.H., Zuckerbraun, H.L. (2011) Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J. Toxicol.* 2011.
- Bachate, A., Kshirsagar, R., Patil, B., Bhargavanandha, K. (2021) Studies on the effect of addition of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on quality of frozen dessert (Kulfi). *Pharma Innovation* **10**, 1418 – 1421.
- Badmus, M., Liu, J., Wang, N., Radacsi, N., Zhao, Y. (2021) Hierarchically electrospun nanofibers and their applications: A review. *Nano Mater. Sci.* **3**, 213-232.
- Baghel, S., Cathcart, H., O'Reilly, N.J. (2016) Polymeric amorphous solid dispersions: A review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II Drugs. *J. Pharm. Sci.* **105**, 2527-2544.
- Bahloul, N., Bellili, S., Aazza, S., Chérif, A., Faleiro, M.L., Antunes, M.D., Miguel, M.G., Mnif, W. (2016) Aqueous extracts from Tunisian *Diplotaxis*: Phenol content, antioxidant

and anti-acetylcholinesterase activities, and impact of exposure to simulated gastrointestinal fluids. *Antioxidants* **5**, 12.

Bai, L., Liu, F., Xu, X., Huan, S., Gu, J., McClements, D.J. (2017) Impact of polysaccharide molecular characteristics on viscosity enhancement and depletion flocculation. *J. Food Eng.* **207**, 35–45.

Bak, J.H., Yoo, B. (2018) Effect of CMC addition on steady and dynamic shear rheological properties of binary systems of xanthan gum and guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.* **115**, 124-128.

Ballesteros-Ramírez, R., Lasso, P., Urueña, C., Saturno, J., Fiorentino, S. (2024) Assessment of acute and chronic toxicity in wistar rats (*Rattus norvegicus*) and New Zealand Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of an enriched polyphenol extract obtained from *Caesalpinia spinosa*. *J. Toxicol.* **2024**, 3769933.

Baltrusch, K.L., Torres, M.D., Domínguez, H., Flórez-Fernández, N. (2022) Spray-drying microencapsulation of tea extracts using green starch, alginate or carrageenan as carrier materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **203**, 417-429.

Barak, S., Mudgil, D., Taneja, S. (2020) Exudate gums: chemistry, properties and food applications—a review. *J. Sci. Food Agr.* **100**, 2828-2835.

Barón-Mendoza, I., González-Arenas, A. (2022) Relationship between the effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on brain plasticity and the improvement on cognition and behavior in individuals with autism spectrum disorder. *Nutr. Neurosci.* **25**, 387-410.

Barth, A., Zscherp, C. (2002) What vibrations tell about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 369-430.

Bartkiene, E., Sakiene, V., Bartkevics, V., Wiacek, C., Rusko, J., Lele, V., Ruzauskas, M., Juodeikiene, G., Klupsaite, D., Bernatoniene, J. (2018) Nutraceuticals in gummy candies form prepared from lacto-fermented lupine protein concentrates, as high-quality protein source, incorporated with *Citrus paradise* L. essential oil and xylitol. *Int. J. Food Sci. Tech.* **53**, 2015–2025.

Bass, R., Ruddock, L. W., Klappa, P., Freedman, R.B. (2004) A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 5257-5262.

Baydoun, S., Lamis, C., Helena, D., Nelly, A. (2015) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. *J. Ethnopharmacol.* **173**, 139–156.

Becker, H., Hsieh, W.C., Wylde, R., Laffite, C., Andary, C. (1982) Structure of echinacoside. *Z. Naturforsch C.* **37**, 351–353.

Behera, S., Dev, M.J., Singhal, R.S. (2022) Cross-linked β -mannanase aggregates: preparation, characterization, and application for producing partially hydrolyzed guar gum. *Appl. Biochem. Biotech.* **194**, 1981-2004.

Bektašević, M., Jurin, M., Roje, M., Politeo, O. (2023) Phytochemical Profile, Antioxidant activity and cholinesterase inhibition potential of essential oil and extracts of *Teucrium montanum* from Bosnia and Herzegovina. *Separations* **10**, 421.

- Bello, A.B., Kim, D., Kim, D., Park, H., Lee, S.-H. (2020) Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Eng. Part B-Rev.* **26**, 2.
- Bezić, N., Vuko, E., Dunkić, V., Ruščić, M., Blažević, I., Burčul, F. (2011) Antiphytoviral activity of sesquiterpene-rich essential oils from four Croatian *Teucrium* species. *Molecules* **16**, 8119-8129.
- Bhalli, J.A., Neft, R., Noteboom, J., Tebbe, C.C., Chan, M., Kuhn, K., Pearce, G., Jordan, L., Beevers, C. (2019) Caffeic acid genotoxicity: correlation of the pig-a assay with regulatory genetic toxicology *in vivo* endpoints. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**, 837-844.
- Bhat, V.G., Masti, S.P., Narasagoudr, S., Chougale, R.B., Kumar, P., Vantamuri, A.B. (2023) Development and characterization of chitosan/guar gum/gum ghatti bionanocomposites with *in situ* silver nanoparticles. *Chem. Data Collect.* **44**, 101009.
- Bian, P., Liu, C., Hu, W., Ding, Y., Qiu, S., Li, L. (2021) Echinacoside suppresses the progression of breast cancer by downregulating the expression of miR-4306 and miR-4508. *Integr. Cancer Ther.* **20**, 15347354211062639.
- Biduski, B., da Silva, W.M.F., Colussi, R., El Halal, S.L.D.M., Lim, L.T., Dias, A.R.G., Zavareze, E.D.R. (2018) Starch hydrogels: The influence of the amylose content and gelatinization method. *Int. J. Biol. Macromol.* **113**, 443-449.
- Board, P.G., Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1830**, 3267-3288.
- Bodbodak, S., Shahabi, N., Mohammadi, M., Ghorbani, M., Pezeshki, A. (2021) Development of a novel antimicrobial electrospun nanofiber based on polylactic acid/hydroxypropyl methylcellulose containing pomegranate peel extract for active food packaging. *Food Bioprocess Tech.* **14**, 2260-2272.
- Boonyai, P., Bhandari, B.; Howes, T. (2004) Stickiness measurement techniques for food powders: A review. *Powder Technol.* **145**, 34-46.
- Bordón, M.G., Barrera, G.N., González, A., Ribotta, P.D., Martinez, M.L. (2023) Complex coacervation and freeze drying using whey protein concentrate, soy protein isolate and arabic gum to improve the oxidative stability of chia oil. *J. Sci. Food Agr.* **103**, 3322-3333.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28**, 25-30.
- Brentan Silva, D., Turatti, I.C.C., Gouveia, D.R., Ernst, M., Teixeira, S.P., Lopes, N.P. (2014) Mass spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. *Sci. Rep.* **4**, 4309.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019) INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* **14**, 991-1014.

Bulut, G., Tuzlaci, E. (2013) An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa – Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **149**, 633–647.

Bulut, G., Tuzlaci, E. (2015) An ethnobotanical study of medicinal plants in Bayramiç (Çanakkale Turkey). *Marmara Pharm. J.* **19**, 268–282.

Bumedi, F., Aran, M., Miri, M. A., Seyedabadi, E. (2023) Preparation and characterization of zein electrospun fibers loaded with savory essential oil for fruit preservation. *Ind. Crops Prod.* **203**, 117121.

Cabral, B.R.P., de Oliveira, P.M., Gelfuso, G.M., Quinto, T.D.S.C., Chaker, J.A., Karnikowski, M.G.D.O., Gris, E.F. (2018) Improving stability of antioxidant compounds from *Plinia cauliflora* (jaboticaba) fruit peel extract by encapsulation in chitosan microparticles. *J. Food Eng.* **238**, 195–201.

Çaçan E., Kokten, K., Kilic, O. (2018) Leaf fatty acid composition of some Lamiaceae taxa from Turkey. *Prog. Nutr.* **20**, 231-236.

Cai, L., Wu, S., Jia, C., Cui, C., Sun-Waterhouse, D. (2023) Active peptides with hypoglycemic effect obtained from hemp (*Cannabis sativa* L.) protein through identification, molecular docking, and virtual screening. *Food Chem.* **429**, 136912.

Çalış, İ., Başer, K. H. C. (2021) Review of studies on *Phlomis* and *Eremostachys* species (Lamiaceae) with emphasis on iridoids, phenylethanoid glycosides, and essential oils. *Planta Med.* **87**, 1128-1151.

Cao, C., Yuan, D., Kong, B., Chen, Q., He, J., Liu, Q. (2022) Effect of different κ -carrageenan incorporation forms on the gel properties and *in vitro* digestibility of frankfurters. *Food Hydrocolloid.* **129**, 107637.

Carbonaro, M. Nutraceutical perspectives of pulses (2021) U: *Pulse Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications*, 2.izd., (Tiwari, B.K., Gowen, A., Mckenna, B., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 423–460.

Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., Lattanzio, V. (2012) Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 1822-1829.

Cardoso, C., Afonso, C., Lourenco, H., Costa S., Nunes, M.L. (2015) Bioavailability assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends Food Sci.Tech.* **41**, 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.008>.

Carnoy, A. (1959) Dictionnaire étymologique des noms grecs de plantes. Publications Universitaires, Louvain.

Carolo, A., Melotti, L., Zivelonghi, G., Sacchetto, R., Akyürek, E. E., Martinello, T., Venerando, A., Iacopetti, I., Sugni, M., Martinelli, G., Roncoroni, M., Marzorati, S., Barbon, S., Contran, M., Incendi, D., Perozzo, F. Porzionato, A. Vindigni, V, Patruno, M. (2023) Mutable collagenous tissue isolated from echinoderms leads to the production of a dermal template that is biocompatible and effective for wound healing in rats. *Mar. Drugs* **21**, 506.

Carr, J.M., Sufferling, K., Poppe, J. (1995) Hydrocolloids and their use in the confectionery industry. *Food Technol.* **49**, 41-42.

Casazza, A.A., Pettinato, M. Perego, P. (2020) Polyphenols from apple skins: A study on microwave-assisted extraction optimization and exhausted solid characterization. *Sep. Purif. Technol.* **240**, 116640.

Castro-López, C., Espinoza-González, C., Ramos-González, R., Boone-Villa, V.D., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, G.C., Aguilar, C.N., Ventura-Sobrevilla, J.M. (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**, 110291.

Catinella, G., Badalamenti, N., Iardi, V., Rosselli, S., De Martino, L., Bruno, M. (2021) The essential oil compositions of three *Teucrium* taxa growing wild in Sicily: HCA and PCA analyses. *Molecules* **26**, 643.

Cedeño-Pinos, C., Martínez-Tomé, M., Jordán, M.J., Banón, S. (2023) Revalorisation of sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl) by-product extracts as a source of polyphenol antioxidants for novel jelly candies. *Antioxidants* **12**, 159.

Cedeño-Pinos, C., Martínez-Tomé, M., Murcia, M.A., Jordán, M.J., Banón, S. (2020) Assessment of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract as antioxidant in jelly candies made with fructan fibres and stevia. *Antioxidants* **9**, 1289.

Celebioglu, A., Uyar, T. (2021) Electrohydrodynamic encapsulation of eugenol-cyclodextrin complexes in pullulan nanofibers. *Food Hydrocolloid.* **111**, 106264.

Chadwick, K.D., Fletcher, A.M., Parrula, M.C., Bonner-Weir, S., Mangipudy, R.S., Janovitz, E., Graziano, M.J., Roy, D., Reilly, T.P. (2014) Occurrence of spontaneous pancreatic lesions in normal and diabetic rats: A potential confounding factor in the nonclinical assessment of GLP-1-based therapies. *Diabetes* **63**, 1303-1314.

Chandrasekaran, B., Abed, S.N., Al-Attraqchi, O., Kuche, K., Tekade, R.K. (2018) Computer-aided prediction of pharmacokinetic (ADMET) properties. U: *Dosage form design parameters* (Tekade, R.K., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 731-755.

Chang, Y.W., Yao, H.T., Hsieh, S.H., Lu, T.J., Yeh, T.K. (2007) Quantitative determination of salidroside in rat plasma by on-line solid-phase extraction integrated with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **857**, 164-169.

Chaumon, M., Goëlo, V., Ribeiro, A.M., Rocha, F., Estevinho, B.N. (2020) *In vitro* evaluation of microparticles with *Laurus nobilis* L. extract prepared by spray-drying for application in food and pharmaceutical products. *Food Bioprod. Process* **122**, 124-135.

Chen, F., Chi, C. (2021) Development of pullulan/carboxylated cellulose nanocrystal/tea polyphenol bionanocomposite films for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* **186**, 405-413.

Chen, J.Y. (2020) Effect of acteoside on delaying senescence and improving immune function in SAMP8 mice. *Chin. Pharmacol. Bull.* **36**, 682–686.

Chen, S., Han, Y., Jian, L., Liao, W., Zhang, Y., Gao, Y. (2020) Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. *Carbohydr. Polym.* **236**, 116090.

- Chen, S., Li, Q., McClements, D.J., Han, Y., Dai, L., Mao, L., Gao, Y. (2020) Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloid*. **99**, 105334.
- Chen, S., Sun, C., Wang, Y., Han, Y., Dai, L., Abliz, A., Gao, Y. (2018). Quercetagenin-loaded composite nanoparticles based on zein and hyaluronic acid: Formation, characterization, and physicochemical stability. *J. Agr. Food Chem.* **66**, 7441-7450.
- Cheng, E., Geng, Z., Xiang, L., Zhao, X., Xiang, A., Tian, H. (2024) Development of vitamin C-loaded electrospun nanofibers of mixture of polysaccharides of pullulan/xanthan gum for fast dissolving oral film applications. *Materials* **17**, 861.
- Cheohen, C.F.D.A.R., Esteves, M.E.A., da Fonseca, T.S., Leal, C.M., Assis, F.D.L.F., Campos, M.F., Rebelo, R.S., Allonso, D., Leitão, G.G., da Silva M.L., Leitão, S.G. (2023) In silico screening of phenylethanoid glycosides, a class of pharmacologically active compounds as natural inhibitors of SARS-CoV-2 proteases. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **21**, 1461-1472.
- Chi, H.Y., Chang, N.Y., Li, C., Chan, V., Hsieh, J.H., Tsai, Y.H., Lin, T. (2022) Fabrication of gelatin nanofibers by electrospinning - mixture of gelatin and polyvinyl alcohol. *Polymers* **14**(13), 2610.
- Chittasupho, C., Athikomkulchai, S., Samee, W., Na Takuathung, M., Yoojin, W., Sawangrat, K., Saenjum, C. (2023) Phenylethanoid glycoside-enriched extract prepared from *Clerodendrum chinense* leaf inhibits A549 lung cancer cell migration and apoptosis induction through enhancing ROS production. *Antioxidants* **12**, 461.
- Chokshi, R.J., Shah, N.H., Sandhu, H.K., Malick, A.W., Zia, H. (2008) Stabilization of low glass transition temperature indomethacin formulations: Impact of polymer-type and its concentration. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2286-2298.
- Chopin, T., Kerin, B.F., Mazerolle, R. (1999) Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycol. Res.* **4**, 167-188.
- Cindrić, I.J., Zeiner, M., Glamuzina, E., Stinger, G. (2013) Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchem. J.* **107**, 185-189.
- Clasen, C., Phillips, P.M., Palangetic, L., Vermant, A.J. (2012) Dispensing of rheologically complex fluids: The map of misery. *AIChE J.* **58**, 3242-3255.
- CLSI (2007) Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venepuncture-CLSI: H3-A6. 6. izd., CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
- Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* **26**, 249-261.
- Constantino, A.B.T., Garcia-Rojas, E.E. (2023) Microencapsulation of beta-carotene by complex coacervation using amaranth carboxymethyl starch and lactoferrin for application in gummy candies. *Food Hydrocolloid*. **139**, 108488.
- Couto, N., Wood, J., Barber, J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Bio. Med.* **95**, 27-42.

Cuba-Chiem, L.T., Huynh, L., Ralston, J., Beattie, D.A. (2008) In situ particle film ATR FTIR spectroscopy of carboxymethyl cellulose adsorption on talc: Binding mechanism, pH effects, and adsorption kinetics. *Langmuir*, **24**, 8036–8044.

Cui, H., Surendhiran, D., Li, C., Lin, L. (2020) Biodegradable zein active film containing chitosan nanoparticle encapsulated with pomegranate peel extract for food packaging. *Food Packaging Shelf* **24**, 100511.

Cui, Q., Pan, Y., Bai, X., Zhang, W., Chen, L., Liu, X. (2016) Systematic characterization of the metabolites of echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa* in rat plasma, bile, urine and feces based on UPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 1406-1415.

Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Gašić, U., Tešić, Ž., Zengin, G., Mašković, P., Mahomoodally, M.F., Đurović, S. (2018) Subcritical water extraction as a cutting edge technology for the extraction of bioactive compounds from chamomile: Influence of pressure on chemical composition and bioactivity of extracts. *Food Chem.* **266**, 389-396.

Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Jerković, J., Zengin, G., Gašić, U., Tešić, Ž., Mašković, P., Soares, C., Barroso, M.F., Delerue-Matos, C., Đurović, S. (2019) The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* **271**, 328-337.

Cvetanović, A., Uysal, S., Pavlić, B., Sinan, K. I., Llorent-Martínez, E. J., Zengin, G. (2020) *Tamarindus indica* L. seed: Optimization of maceration extraction recovery of tannins. *Food Anal. Method.* **13**, 579-590.

da Silva, N.C., de Barros-Alexandrino, T.T., Assis, O.B.G., Martelli-Tosi, M. (2021) Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. *Food Chem.* **354**, 129553.

Daga, P., Vaishnav, S.R., Dalmia, A., Tumaney, A.W. (2022) Extraction, fatty acid profile, phytochemical composition and antioxidant activities of fixed oils from spices belonging to Apiaceae and Lamiaceae family. *J. Food Sci. Tech.* **59**, 518-531.

Dănilă, E., Stan, R., Kaya, M.A., Voicu, G., Marin, M.M., Moroşan, A., Titorencu, I., Țuțuianu, R. (2021) Valorization of Cyprinus Carpio skin for biocompatible collagen hydrolysates with potential application in foods, cosmetics and pharmaceuticals. *Waste Biomass Valorization* **13**, 917-928.

Davis, M.T., Egan, D.P., Kuhs, M., Albadarin, A.B., Griffin, C.S., Collins, J.A., Walker, G.M. (2016) Amorphous solid dispersions of BCS class II drugs: A rational approach to solvent and polymer selection. *Chem. Eng. Res. Des.* **110**, 192-199.

de Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., Botrel, D.A. (2014) Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr. Polym.* **101**, 524-532.

de Mouraa, S.C.S.R., Berlingb, C.L., Garciac, A.O., Queirozd, M.B., Alvimd, I.D., Hubinger, M.D. (2023) Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Res. Int.* **121**, 542–552.

Deng, L., Zhang, X., Li, Y., Que, F., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H. (2018) Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocolloid.* **75**, 72-80.

Desplanques, S., Renou, F., Grisel, M., Malhiac, C. (2012) Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloid*. **27**, 401–410.

Dhanalakshmi, K., Ghosal, S., Bhattacharya, S. (2011) Agglomeration of food powder and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 432–441.

Di Novella, R., Di Novella, N., De Martino, L., Mancini, E., De Feo, V. (2013) Traditional plant use in the National park of Cilento and Vallo di Diano, Campania, Southern, Italy. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 328–342.

Di Sanzo, P., De Martino, L., Mancini, E., De Feo, V. (2013) Medicinal and useful plants in the tradition of Rotonda, Pollino National Park, Southern Italy. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **9**, 19.

Dias, D.R., Botrel, D.A., Fernandes, R.V.D.B., Borges, S.V. (2017) Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Curr. Opin. Food Sci.* **13**, 31–37.

Đilas, S.M., Markov, S.L., Cvetković, D.D., Čanadanović-Brunet, J.M., Četković, G.S., Tumbas, V.T. (2006) Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Teucrium montanum*. *Fitoterapia* **77**, 401–403.

Ding, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zeng, F., Zhen, Q., Zhao, H., Li, J., Ma, T., Huang, C. (2023) Echinacoside from *Cistanche tubulosa* ameliorates alcohol-induced liver injury and oxidative stress by targeting Nrf2. *FASEB J.* **37**, e22792.

do Nascimento, R. R., Pimentel, T. C., Garcia, S., Prudencio, S. H. (2023) Acacia gum candy with *Limosilactobacillus reuteri* and lemongrass essential oil: Effect of storage time on physicochemical characteristics and probiotic survival. *Food Biosci.* **56**, 103128.

Dobson, C.C., Mottawea, W., Rodrigue, A., Buzati Pereira, B.L., Hammami, R., Power, K.A., Bordenave, N. (2019) Chapter Three- Impact of molecular interactions with phenolic compounds on food polysaccharides functionality. U: *Advances in Food and Nutrition Research* (Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., ujed.), Academic Press: Cambridge, str. 135–181.

Dolina, K., Łuczaj, Ł. (2014) Wild food plants used on the Dubrovnik coast (south-eastern Croatia). *Acta Soc. Bot. Pol.* **83**, 175–181.

Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. (2019) The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Crit. Rev. Food Sci.* **60**, 1738 – 1746.

Dong, S., Feng, S., Liu, F., Li, R., Li, W., Liu, F., Shi, G., Chen, L., Zhang, Y. (2021) Factors influencing the adhesive behavior of carboxymethyl cellulose-based hydrogel for food applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **179**, 398–406.

Dong, Z., Lu, X., Tong, X., Dong, Y., Tang, L., Liu, M. (2017) Forsythiae fructus: a review on its phytochemistry, quality control, pharmacology and pharmacokinetics. *Molecules* **22**, 1466.

Doshi, J., Reneker, D. H. (1995) Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat.* **35**, 151–160.

Dražen, V.D., Polavder, S., Stojiljković, M.M., Jurišić, B., Bojat, N.C. (2013) Content and allocation of nickel, chromium, cobalt, copper and zinc in *Teucrium montanum* L.: From serpentine habitats in Serbia. *Acta Agric. Serb.* **18**, 101–110.

Dringen, R., Brandmann, M., Hohnholt, M.C., Blumrich, E.M. (2015) Glutathione-dependent detoxification processes in astrocytes. *Neurochem. Res.* **40**, 2570-2582.

Drosou, C., Krokida, M., Biliaderis, C.G. (2018) Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. *Food Hydrocolloid.* **77**, 726-735.

Duan, M., Sun, J., Yu, S., Zhi, Z., Pang, J., Wu, C. (2023) Insights into electrospun pullulan-carboxymethyl chitosan/PEO core-shell nanofibers loaded with nanogels for food antibacterial packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* **233**, 123433.

Duhan, N., Sahu, J.K., Mohapatra, A., Naik, S.N. (2021) Microencapsulation of ghee flavorants with whey protein concentrate and guar gum using spray drying. *J. Food Process. Pres.* **45**, e15537.

EC (2006) Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *OJ L404/9*. EC – European Commission, Bruxelles, <<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.

EC (2012) Regulation (EU) No 1047/2012 of 8 November 2012 amending Regulation (EC) No 1924/2006 with regard to the list of nutrition claims Text with EEA relevance. *OJ L310/36*. EC – European Commission, Bruxelles, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32012R1047>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.

EC (2015) Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods, amending Regulation (EU) No. 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No. 1852/2001. *SL L 327*. EC – European Commission, Bruxelles, <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32015R2283>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.

EFSA (2016) Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of a health claim application (Revision 2). EFSA – European Food Safety Agency <[Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of a health claim application \(Revision 2\) \(wiley.com\)](https://www.efsa.europa.eu/en/technical-guidance/health-claims)> Pristupljeno 5. svibnja 2024.

Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M. (2016) Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother. Res.* **30**, 1379-1391.

Eldesoky, A.H., Abdel-Rahman, R.F., Ahmed, O.K., Soliman, G.A., Saeedan, A.S., Elzorba, H.Y., Elansary, A.A., Hattori, M. (2018) Antioxidant and hepatoprotective potential of *Plantago major* growing in Egypt and its major phenylethanoid glycoside, acteoside. *J. Food Biochem.* **42**, e12567.

Eldin, S.M.S., Shawky, E., Sallam, S.M., El-Nikhely, N., El Sohafy, S.M. (2021) Metabolomics approach provides new insights into the immunomodulatory discriminatory biomarkers of the herbs and roots of *Echinacea* species. *Ind. Crops Prod.* **168**, 113611.

Escamilla-García, M., Calderon-Dominguez, G., Chanona-Perez, J.J., Farrera-Rebollo, R.R., Andraca-Adame, J.A., Arzate-Vazquez, I., Mendez-Mendez, J.V., Moreno-Ruiz, L.A. (2013) Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 196-203.

Esposito, T., Sansone, F., Auriemma, G., Franceschelli, S., Pecoraro, M., Picerno, P., Aquino, R.P., Mencherini, T. (2020) Study on *Ajuga reptans* extract: A natural antioxidant in microencapsulated powder form as an active ingredient for nutraceutical or pharmaceutical purposes. *Pharmaceutics* **12**, 671.

Estevinho, B.N., Horciu, I.L., Blaga, A.C., Rocha, F. (2021) Development of controlled delivery functional systems by microencapsulation of different extracts of plants: *Hypericum perforatum* L., *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum*. *Food Bioprocess Tech.* **14**, 1503-1517.

Estrada-Castillón, E., Villarreal-Quintanilla, J.A., Rodríguez-Salinas, M.M., Encinas-Domínguez, J.A., González-Rodríguez, H., Figueroa, G.R., Arévalo, J.R. (2018) Ethnobotanical survey of useful species in Bustamante, Nuevo León, Mexico. *Hum. Ecol.* **46**, 117–132.

Estrella-Osuna, D.E., Tapia-Hernández, J.A., Ruíz-Cruz, S., Márquez-Ríos, E., Ornelas-Paz, J. D. J., Del-Toro-Sánchez, C.L., Ocaño-Higuera, V.M., Rodríguez-Félix, F., Estrada-Alvarado, M.I., Cira-Chávez, L.A. (2022) Nanoencapsulation of eggplant (*Solanum Melongena* l.) peel extract in electrospun gelatin nanofiber: preparation, characterization, and *in vitro* release. *Nanomaterials* **12**, 2303.

Estupiñan-Amaya, M., Fuenmayor, C.A., López-Córdoba, A. (2022) Evaluation of mixtures of maltodextrin and gum Arabic for the encapsulation of Andean blueberry (*Vaccinium meridionale*) juice by freeze–drying. *Int. J. Food Sci. Tech.* **57**, 7379-7390.

Etzbach, L., Meinert, M., Faber, T., Klein, C., Schieber, A., Weber, F. (2020) Effects of carrier agents on powder properties, stability of carotenoids, and encapsulation efficiency of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) powder produced by co-current spray drying. *Curr. Res. Food Sci.* **3**, 73–81.

Ewaldz, E., Randrup, J., Brettmann, B. (2021) Solvent effects on the elasticity of electrospinnable polymer solutions. *ACS Polym. Au* **2**, 108-117.

Fafal, T., Kaftan, G., Tastan, P., Kivcak, B., Armagan, G. (2022) Comparing the fatty acid composition and neuroprotective effects of some Lamiaceae taxa from Turkey. *Chem. Nat. Compd.* **58**, 208-212.

Fairweather-Tait, S.J (1993) Bioavailability of nutrients. U: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition* (Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J., ured.), Academic Press, London, str. 384–388.

Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 510e523.

Fatiha, B. A., Ouafae, B., Souad, S., Fatima, E. H., Jamila, D., Allal, D., Lahcen, Z. (2017) Ethnobotany study of medicinal plants used in the treatment of respiratory diseases in the middle region of Oum Rbai. *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.* **2**, 238815.

Federici, E., Selling, G.W., Campanella, O.H., Jones, O.G. (2021) Thermal treatment of dry zein to improve rheological properties in gluten-free dough. *Food Hydrocolloid.* **115**, 106629.

Fedorova, M., Bollineni, R.C., Hoffmann, R. (2014) Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* **33**, 79-97.

Feng, J.J. (2002) The stretching of an electrified non-Newtonian jet - A model for electrospinning. *Phys. Fluids* **14**, 3912–3926.

Feng, J.J. (2003) Stretching of a straight electrically charged viscoelastic jet. *J Non-Newton. Fluid* **116**, 55–7.

Fennema, O.R. (2008) *Food Chemistry*, 4. izd., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A. (2009) *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr.Res.* **29**, 751-760.

Ferreres, F., Silva, B.M., Ferreira, M.A. (2003) Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.* **14**, 352–359.

Ferrier, J., Šačiragić, L., Chen, E.C.H., Trakić, S., Saleem, A., Alikadić, E., Cuerrier, A., Balick, M.J., Arnason, J.T., Redžić, S. (2014) Ways the Lukomir highlanders of Bosnia and Herzegovina treat diabetes. U: *Ethnobotany and biocultural diversities in the Balkans* (Pieroni, A., Quave, C.L., ured.), Springer Publishing, NewYork, str. 13–27.

Ficai, A., Albu, M. G., Birsan, M., Sonmez, M., Ficai, D., Trandafir, V., Andronescu, E. (2013) Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. *J. Mol. Struct.* **1037**, 154-159.

Figuroa, J.G., Borrás-Linares, I., Del Pino-García, R., Curiel, J.A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. (2021) Functional ingredient from avocado peel: Microwave-assisted extraction, characterization and potential applications for the food industry. *Food Chem.* **352**, 129300.

Filkova, I., Huang, L.X., Mujumdar, A.S. (2006) Industrial spray drying systems. U: *Handbook of Industrial Drying*, 3. izd. (. Mujumdar, A.S., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 215-256.

Foegeding, E.A., Davis, J.P. (2011) Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloid.* **25**, 1853–1864.

Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. (1999) Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **40**, 4585-4592.

Fongin, S., Kawai, K., Harnkarnsujarit, N., Hagura, Y.(2017) Effects of water and maltodextrin on the glass transition temperature of freeze-dried mango pulp and an empirical model to predict plasticizing effect of water on dried fruits. *J. Food Eng.* **210**, 91-97.

Formhals, A. (1934) Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent No. 1975504.

Fratzl, P. (2008) Collagen: structure and mechanics, an introduction. U: *Collagen: structure and mechanics* (Fratzl, P., ured.), Springer, New York, str. 1-13.

Fu, G., Pang, H., Wong, Y.H. (2008) Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **15**, 25.

Fu, Z., Fan, X., Wang, X., Gao, X. (2018) *Cistanches herba*: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property. *J Ethnopharmacol.* **219**, 233-247.

- Fu, Z., Han, L., Zhang, P., Mao, H., Zhang, H., Wang, Y., Gao, X., Liu, E. (2020) Cistanche polysaccharides enhance echinacoside absorption *in vivo* and affect the gut microbiota. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 732-740.
- Gad, S.C. (2008) Carcinogenicity studies. U: *Preclinical development handbook: toxicology* (Gad, S.C., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 423 – 458.
- Gahruie, H.H., Parastouei, K., Mokhtarian, M., Rostami, H., Niakousari, M., Mohsenpour, Z. (2020) Application of innovative processing methods for the extraction of bioactive compounds from saffron (*Crocus sativus*) petals. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, **19**, 100264.
- Gali, L., Bedjou, F., Ferrari, G., Donsì, F. (2022) Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L. *Food Chem.* **367**, 129982.
- Ganeshkumar, M., Ponrasu, T., Subamekala, M. K., Janani, M., Suguna, L. (2016) Curcumin loaded on pullulan acetate nanoparticles protects the liver from damage induced by DEN. *RSC Adv.* **6**, 5599-5610.
- Gang, Z., Shi, A., Fan, Z., Ye, D. (2015) Salidroside inhibits the growth of human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Rep.* **33**, 2553-2560.
- Gao, Y., Zong, C., Liu, F., Fang, L., Runlan, C., Shi, Y., Chen, X., Qi, Y. (2015) Evaluation of the intestinal transport of a phenylethanoid glycoside-rich extract from *Cistanche deserticola* across the Caco-2 cell monolayer model. *PLOS One* **10**, e0116490.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **482**, 419-425.
- Ge, G., Guo, W., Zheng, J., Zhao, M., Sun, W. (2021) Effect of interaction between tea polyphenols with soymilk protein on inactivation of soybean trypsin inhibitor. *Food Hydrocolloid.* **111**, 106177.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007) Applications of spraydrying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107-1121.
- Gholizadeh, S., Almasi, H., Amjadi, S., Moradi, M., Ghadiri Alamdari, N., Salmasi, S., Divsalar, E. (2024) Development and characterization of active packaging system based on zein nanofibers mat incorporated with geraniol-loaded nanoliposomes. *Food Sci. Nutr.*
- Ghorani, B., Emadzadeh, B., Rezaeina, H., Russell, S.J. (2020) Improvements in gelatin cold water solubility after electrospinning and associated physicochemical, functional and rheological properties. *Food Hydrocolloid.* **104** 105740.
- Ghorbani, A. (2005) Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (Part 1): general results. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 58–68.
- Glusac, J., Fishman, A. (2021) Enzymatic and chemical modification of zein for food application. *Trends Food Sci. Tech.* **112**, 507-517.
- Goldoni, L. (2004) *Tehnologija konditorskih proizvoda: bombonski proizvodi*. Kugler, Zagreb, str. 288-290.
- Gomez-Estaca, J., Balaguer, M.P., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2012) Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing

variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloid*. **28**, 82–91.

Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P. (2011) FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloid*. **25**, 1514–1520.

Gong, J., Miao, H., Sun, X., Hou, W., Chen, J., Xie, Z., Liao, Q. (2016) Simultaneous qualitative and quantitative determination of phenylethanoid glycosides and flavanoid compounds in *Callicarpa kwangtungensis* Chun by HPLC-ESI-IT-TOF-MS/MS coupled with HPLC-DAD. *Anal. Methods* **8**, 6323–6336.

González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., ElJohrig, S. (2008) Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol.* **116**, 341–357.

Goula, A.M., Adamopoulos, K.G. (2004) Spray drying of tomato pulp: effect of feed concentration. *Dry. Technol.* **22**(10), 2309-2330.

Grace, M.H., Hoskin, R., Xiong, J., Lila, M.A. (2021) Whey and soy proteins as wall materials for spray drying rosemary: Effects on polyphenol composition, antioxidant activity, bioaccessibility after *in vitro* gastrointestinal digestion and stability during storage. *LWT-Food Sci. Technol.* **149**, 111901.

Gradzielski, M. (2023) Polymer–surfactant interaction for controlling the rheological properties of aqueous surfactant solutions. *COCIS* **63**, 101662.

Grillo, G., Boffa, L., Talarico, S., Solarino, R., Binello, A., Cavaglià, G., Bensaid, S., Telysheva, G., Cravotto, G. (2020) Batch and flow ultrasound-assisted extraction of grape stalks: Process intensification design up to a multi-kilo scale. *Antioxidants* **9**, 730.

Grubešić, R., Kremer, D., Vladimir-Knežević, S., Rodríguez, J. (2012) Analysis of polyphenols, phytosterols, and bitter principles in *Teucrium* L. species. *Open Life Sci.* **7**, 542-550.

Gu, F., Kim, J. M., Hayat, K., Xia, S., Feng, B., Zhang, X. (2009) Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein–glucose model system. *Food Chem.* **117**, 48-54.

Gu, L., McClements, D.J., Li, J., Su, Y., Yang, Y., Li, J. (2021) Formulation of alginate/carrageenan microgels to encapsulate, protect and release immunoglobulins: Egg Yolk IgY. *Food Hydrocolloid*. **112**, 106349.

Gunes, S., Tamburaci, S., Tihminlioglu, F. (2020) A novel bilayer zein/MMT nanocomposite incorporated with *H. perforatum* oil for wound healing. *J. Mater. Sci.–Mater. M.* **31**, 1-19.

Guo, J., Zhu, S., Chen, P., Liu, Z., Lin, L., Zhang, J. (2023) Effect of physiological pH on the molecular characteristics, rheological behavior, and molecular dynamics of κ carrageenan/casein. *Front. Nutr.* **10**, 1174888.

Guo, L. I., Hui, L.I., Cui, B.O. (2018) Enzymatic hydrolysis of amylopectins from lotus rhizome and kudzu starches. *J. Food Nutr. Res.* **57**, 396-407.

Guo, L., Hu, J., Zhou, X., Li, X., Du, X. (2016) *In vitro* digestibility of kudzu starch by using α -amylase and glucoamylase. *Starch-Stärke* **68**, 140-150.

Gupta, A.P., Verma, D.K. (2014) Guar gum and their derivatives: A research profile. *Int. J. Adv. Res.* **2**, 680–690.

Gupta, S. (2024) Jellies and gummies market research report information by type (jellies and gummies), by category (conventional and functional), by distribution channel (store-based and non-store-based), and by region (North America, Europe, Asia-Pacific, and rest of the world)-Market forecast till 2030 Source, <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/jellies-gummies-market-1829>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.

Gürbüz, G., Heinonen, M. (2015) LC–MS investigations on interactions between isolated β -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde. *Food Chem.* **175**, 300-305.

Gürdal, B., Kültür, Ş. (2013) An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Mugla, Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **146**, 113–126.

Güzel, Y., Güzel, M., Miski, M. (2015) Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: a multicultural district in Hatay Province of Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **174**, 118 – 152.

Hadni, H., Elhallaouia, M. (2022) In silico design of EGFRL858R/T790M/C797S inhibitors via 3D-QSAR, molecular docking, ADMET properties and molecular dynamics simulations. *Heliyon* **8**, e11537.

Hamilton, C. A., Alici, G., in het Panhuis, M. (2018) 3D printing Vegemite and Marmite: Redefining “breadboards”. *J. Food Eng.* **220**, 83-88.

Han, J., Sun, Y., Wu, T., Hou, X., Zheng, S., Zhang, H., Lin, T., Liu, H., Sun, T. (2023). Echinacoside-Zinc nanomaterial inhibits skin glycation by suppressing the transcriptional activation of the receptor for advanced glycation end-products. *ACS nano* **17**, 14123-14135.

Handscomb, C., Kraft, M., Bayly, A. (2009) A new model for the drying of droplets containing suspended solids. *Chem. Eng. Sci.* **64**, 628-637.

Haque, M.A., Timilsena, Y.P., Adhikari, B. (2015) Spray drying. U: *Drying Technologies for Foods: Fundamentals & Applications* (Nema, P.K., Kaur, B.P., Mujumdar, A.S., ured.), New India Publishing Agency, Delhi, str. 374.

Harborne, J.B., Tomás-Barberán, F.A., Williams, C.A., Gil, M.I. (1986) A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry* **25**, 2811–2816.

Hartel, R.W., von Elbe, J.H., Hofberger, R. (2018) Jellies, gummies and licorices. U: *Confectionery Science and Technology* (Hartel, R.W., von Elbe, J.H., Hofberger, R., ured.), Springer, Cham, str. 329 – 359.

Hashmi, M., Ullah, S., Ullah, A., Saito, Y., Haider, M.K., Bie, X., Wada, K., Kim, I.S. (2012) Carboxymethyl Cellulose (CMC) based electrospun composite nanofiber mats for food packaging. *Polymers* **13**, 302.

He, B., Wang, W., Song, Y., Ou, Y., Zhu, J. (2020) Structural and physical properties of carboxymethyl cellulose/gelatin films functionalized with antioxidant of bamboo leaves. *Int. J. Biol. Macromol.* **164**, 1649–1656.

- He, J., Yang, L. (2021) Diuretic effect of *Lagopsis supina* fraction in saline-loaded rats is mediated through inhibition of aquaporin and renin-angiotensin-aldosterone systems and up-regulation of atriopeptin. *Biomed. Pharmacother.* **139**, 111554.
- He, Q., Su, G., Liu, K., Zhang, F., Jiang, Y., Gao, J., Liu, L., Jiang, Z., Jin, M., Xie, H. (2017) Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PloS one* **12**, e0189837.
- Hedayati, S., Niakousari, M., Damyeh, M. S., Mazloomi, S. M., Babajafari, S., Ansarifard, E. (2021) Selection of appropriate hydrocolloid for eggless cakes containing chubak root extract using multiple criteria decision-making approach. *LWT-Food Sci. Technol.* **141**, 110914.
- Heverly-Coulson, G.S., Boyd, R.J. (2010) Reduction of hydrogen peroxide by glutathione peroxidase mimics: reaction mechanism and energetics. *J. Phys. Chem. A* **114**, 1996-2000.
- Hidas, K.I., Nyulas-Zeke, I.C., Szepessy, A., Romvári, V., Gerhart, K., Surányi, J., Laczay, P., Darnay, L. (2023) Physical properties of hemp drink-based ice cream with different plant proteins guar gum and microbial transglutaminase. *LWT-Food Sci. Technol.* **182**, 114865.
- Hiolle, M., Lechevalier, V., Flourey, J., Boulier-Monthéan, N., Prioul, C., Dupont, D., Nau, F. (2019) *In vitro* digestion of complex foods: How microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. *Food Res. Int.* **128**, 108817.
- Hoseyni, S.Z., Jafari, S.M., Tabarestani, H.S., Ghorbani, M., Assadpour, E., Sabaghi, M. (2020) Production and characterization of catechin-loaded electrospun nanofibers from Azivash gum-polyvinyl alcohol. *Carbohydr. Polym.* **235**, 115979.
- Hou, H., Reneker, D.H. (2004) Carbon nanotubes on carbon nanofibers - A novel structure based on electrospun polymer nanofibers. *Adv. Mater.* **16**, 69-73.
- House, J.D., Neufeld, J., Leson, G. (2010) Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 11801-11807.
- HRN EN 14103:2020, Derivati masti i ulja -- Metilni esteri masnih kiselina -- Određivanje estera i sadržaja metilnih estera linolenske kiseline.
- Hu, J., Prabhakaran, M.P., Ding, X., Ramakrishna, S. (2015) Emulsion electrospinning of polycaprolactone: influence of surfactant type towards the scaffold properties. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **26**, 57-75.
- Huang, M., Theng, A.H.P., Yang, D., Yang, H. (2021) Influence of κ -carrageenan on the rheological behaviour of a model cake flour system. *LWT-Food Sci. Technol.* **136**, 110324.
- Huang, T., Tu, Z.C., Shanguan, X., Sha, X., Wang, H., Zhang, L., Bansal, N. (2019) Fish gelatin modifications: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Tech.* **86**, 260-269.
- Huo, P., Han, X., Zhang, W., Zhang, J., Kumar, P., Liu, B. (2021) Electrospun nanofibers of polycaprolactone/collagen as a sustained-release drug delivery system for artemisinin. *Pharmaceutics* **13**, 1228.
- Hussain, J., Rehman, N.U., Al-Harrasi, A., Ali, L., Khan, A.L., Albroumi, M.A. (2013) Essential oil composition and nutrient analysis of selected medicinal plants in Sultanate of Oman. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **3**, 421-428.

Hussain, W., Ullah, M., Dastagir, G., Badshah, L.A.L. (2018) Quantitative ethnobotanical appraisal of medicinal plants used by inhabitants of lower Kurram, Kurram agency, Pakistan. *Avicenna J. Phytomed.* **8**, 313.

IARC (1993) Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol 56 of monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Imamoglu, H., Coggins, P.C., Rowe, D.E. (2017) Influence of storage time and starches on texture attributes of conventional milk yogurt using response surface methodology. *Int. Food Res. J.* **24**, 1721-1727.

Imran, M., Klouj, A., Revol-Junelles, A.M., Desobry, S. (2014) Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. *J. Food Eng.* **143**, 178-185.

İnan-Çınkır, N., Ağçam, E., Altay, F., Akyıldız, A. (2024) Emulsion electrospinning of zein nanofibers with carotenoid microemulsion: Optimization, characterization and fortification. *Food Chem.* **430**, 137005.

Inokuma, Y., Yoshioka, S., Ariyoshi, J., Arai, T., Hitora, Y., Takada, K., Matsunaga, S., Rissanen, K., Fujita, M. (2013) X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. *Nature* **495**, 461-466.

Irakli, M., Tsifodimou, K., Sarrou, E., Chatzopoulou, P. (2018) Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **8**, 67-74.

Islam, M. S., Yeum, J. H. (2013) Electrospun pullulan/poly (vinyl alcohol)/silver hybrid nanofibers: Preparation and property characterization for antibacterial activity. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **36**, 279-286.

Islam, M.I.U., Langrish, T.A.G. (2010) The Effect of Different Atomizing Gases and Drying Media on the Crystallization Behavior of Spray-Dried Powders. *Dry.Technol.* **28**, 1035-1043.

ISO (1994) Sensory Analysis - Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach. ISO - International Organization for Standardization, Geneva, <https://www.iso.org/standard/19015.html>. Pristupljeno 2. svibnja 2024.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., He, Y. (2008) Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res. Int.* **41**, 172-183.

Jakobek, L. (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* **175**, 556-567.

Jang, T.W., Choi, J.S., Park, J.H. (2020) Protective and inhibitory effects of acteoside from *Abeliophyllum distichum* Nakai against oxidative DNA damage. *Mol. Med. Rep.* **22**, 2076-2084.

Jaradat, N.A. (2005) Ethnopharmacological survey of natural products in Palestine. *An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.)* **19**, 13-67.

- Jarić, S., Maćukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., Pavlović, P. (2015) An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **175**, 93-108.
- Jarić, S., Mitrović, M., Pavlović, P. (2020) Ethnobotanical featured of *Teucrium* species. U: *Teucrium Species: Biology and Applications* (Stanković, M., ured.) Springer Nature Switzerland AG, Berlin, str. 111-142.
- Jaya, S., Das, H. (2008) Glass transition and sticky point temperatures and stability/mobility diagram of fruit powders. *Food Bioprocess Technol.* **2**, 89–95.
- Jedjerek, D., Pawelec, S., Piwowarczyk, R., Pecio, Ł., Stochmal, A. (2020) Identification and occurrence of phenylethanoid and iridoid glycosides in six Polish broomrapes (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp., Orobanchaceae). *Phytochemistry* **170**, 112189.
- Jeran, N., Grdiša, M., Varga, F., Liber, Z., Šatović, Z. (2023) Plant genetic resources conservation: case study of *Teucrium* spp. in Croatia. *58th Croatian & 18th International - Symposium on Agriculture*. Dubrovnik, str. 147-152.
- Jia, C., Shi, H., Wu, X., Li, Y., Chen, J., Tu, P. (2006) Determination of echinacoside in rat serum by reversed-phase high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to pharmacokinetics and bioavailability. *J. Chromatogr. B.* **844**, 308-313.
- Jia, Y., Guan, Q., Jiang, Y., Salh, B., Guo, Y., Tu, P., Du, C. (2014) Amelioration of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by echinacoside-enriched extract of *Cistanche tubulosa*. *Phytother. Res.* **28**, 110–119.
- Jiang, T., Yuan, D., Wang, R., Zhao, C., Xu, Y., Liu, Y., Song, W., Su, X., Wang, B. (2023) Echinacoside, a promising sortase A inhibitor, combined with vancomycin against murine models of MRSA-induced pneumonia. *Med. Microbiol. Immun.* **212**, 421-435.
- Jiang, Y., Mao, S., Huang, W., Lu, B., Cai, Z., Zhou, F., Li, M., Lou, T., Zhao, Y. (2016) Phenylethanoid glycoside profiles and antioxidant activities of *Osmanthus fragrans* Lour. Flowers by UPLC/PDA/MS and simulated digestion model. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 2459–2466.
- Jiménez, C, Riguera, R. (1994) Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nat. Prod. Rep.* **11**, 591-606.
- Jing, W., Chunhua, M., Shumin, W. (2015) Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF-κB pathway *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharm.* **285**, 128-135.
- Jirsak, O., Sanetnik, F., Lukas, D., Na, Z. Koteck. V. 2005. CZ Patent WO2005024101.
- Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Gođevac, D.M., Bugarski, B.M. (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.* **179**, 369-380.
- Ju, Z., Howard, L.R. (2005) Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *J. Food Sci.* **70**, 270-276.

- Jurić, T., Uka, D., Holló, B. B., Jović, B., Kordić, B., Popović, B.M. (2021) Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* **343**, 116968.
- Jyothi, N.V.N., Prasanna, P.M., Sakarkar, S.N., Prabha, K.S., Ramaiah, P.S., Srawan, G.Y. (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* **27**(3), 187-197.
- Kadifkova-Panovska, T., Kulevanova, S., Stefova, M. (2005) *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharmaceut.* **55**, 207–214.
- Kaeswurm, J.A.H., Burandt, M.R., Mayer, P.S., Straub, L.V., Buchweitz, M. (2022) Bioaccessibility of apple polyphenols from peel and flesh during oral digestion. *J. Agric. Food Chem.* **70**, 4407–4417.
- Karaaslan, M., Şengün, F., Cansu, Ü., Başığit, B., Sağlam, H., Karaaslan, A. (2021) Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food Chem.* **337**, 127748.
- Karabulut, G., Feng, H., Yemiş, O. (2022) Physicochemical and antioxidant properties of industrial hemp seed protein isolate treated by high-intensity ultrasound. *Plant Foods Hum. Nutr.* **77**, 577-583.
- Karaman, S., Kesler, Y., Goksel, M., Dogan, M., Kayacier, A. (2014) Rheological and some Physicochemical properties of selected hydrocolloids and their interactions with guar gum: Characterization using principal component analysis and viscous synergism index. *Int J. Food Prop.* **17**, 1655–1667.
- Karami, Z., Emam-Djomeh, Z., Mirzaee, H.A., Khomeiri, M., Mahoonak, A.S., Aydani, E. (2015) Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. *J. Food Sci. Tech.* **52**, 3242–3253.
- Karioti, A., Fani, E., Vincieri, F.F., Bilia, A.R. (2011) Analysis and stability of the constituents of *Curcuma longa* and *Harpagophytum procumbens* tinctures by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**, 479-486.
- Kartbaeva, E.B., Donald, G.R., Sakipova, Z.B., Ibragimova, L.N., Boylan, F. (2017) Antinociceptive activity of *Cistanche salsa* stolons, growing in the Republic of Kazakhstan. *Rev. Bras. Farmacogn.* **27**, 587–591.
- Kaval, I., Behçet, L., Cakilcioglu, U. (2014) Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **155**, 171–184.
- Kayanna, N., Suppavorasatit, I., Bankeeree, W., Lotrakul, P., Punnapayak, H., Prasongsuk, S. (2022) Production of prebiotic aubasidan-like β -glucan from *Aureobasidium thailandense* NRRL 58543 and its potential as a functional food additive in gummy jelly. *LWT-Food Sci. Technol.* **163**, 113617.
- Keirouz, A., Wang, Z., Reddy, V.S., Nagy, Z.K., Vass, P., Buzgo, M., Ramakrishna, S., Radacsi, N. (2023) The history of electrospinning: past, present, and future developments. *Adv. Mater. Technol.* **8**, 2201723.
- Kersey, K.D., Lee, G.A., Xu, J.H., Kidder, M.K., Park, A.H.A., Joo, Y.L. (2023) Encapsulation of nanoparticle organic hybrid materials within electrospun hydrophobic polymer/ceramic fibers for enhanced CO₂ capture. *Adv. Funct. Mater.* **33**, 2301649.

- Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., Abdelfattah, E.F., Sayadi, S., Allouche, N. (2018) LC–MS MS and GC–MS analyses of biologically active extracts of Tunisian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *J. Food Meas. Charact.* **12**, 209–220.
- Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, J.M., Chun, K.S., Park, J.H., Lee, S.K., Kwon, H., Surh, Y.J. (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* **150**, 41–48.
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K. (2014) Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Ind. Crops Prod.* **61**, 41-48.
- Khan, M.R., Volpe, S., Salucci, E., Sadiq, M.B., Torrieri, E. (2022) Active caseinate/guar gum films incorporated with gallic acid: Physicochemical properties and release kinetics. *J. Food Eng.* **335**, 111190.
- Khan, M.T., Ahmad, L., Rashid, W. (2018) Ethnobotanical documentation of traditional knowledge about medicinal plants used by indigenous people in the Talash Valley of Dir Lower, northern Pakistan. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* **7**, 8–24.
- Khan, S., Jan, G., Bibi, H., Murad, W., Ullah, K. (2018) An ethnomedicinal survey of plants used in traditional medicine in arid and semi-arid zone of Bahadur Khel, district Karak, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 337-349.
- Kim, E.H.J., Dong Chen, X., Pearce, D. (2003) On the mechanisms of surface formation and the surface compositions of industrial milk powders. *Dry Technol.* **21**, 265-278.
- Ko, M.J., Cheigh, C.I., Chung, M.S. (2014) Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem.* **143**, 147–155.
- Kohyama, K., Sodhi, N.S., Suzuki, K., Sasaki, T. (2016) Texture evaluation of cooked rice prepared from japanese cultivars using two-bite instrumental test and electromyography. *J. Texture Stud.* **47**, 188–198.
- Koombhongse, S., Liu, W., Reneker, D.H. (2001) Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **39**(21), 2598-2606.
- Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., Pastore, S. (2011) Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **11**, 823-835.
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Suhan, T., De Luca, C., Pressi, G., Dal Toso, R., Korkina, L. (2008) Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med.* **74**, 509-514.
- Kovačević, N., Lakušić, B., Ristic, M.S. (2001) Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *J. Essent. Oil Res.* **13**, 163-165.
- Krishnappa, R.V.N., Desai, K., Sung, C. (2003) Morphological study of electrospun polycarbonates as a function of the solvent and processing voltage. *J. Mater. Sci.* **38**, 2357 - 2365.
- Kristo, E., Biliaderis, C.G. (2006) Water sorption and thermomechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloid.* **20**, 1057–1071.
- Kristoffersen, K.A., Måge, I., Wubshet, S.G., Böcker, U., Dankel, K.R., Lislelid, A., Rønningen, M.A., Afseth, N.K. (2023) FTIR-based prediction of collagen content in hydrolyzed protein samples. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **301**, 122919.

Kuck, L.S., Noreña, C.P.Z. (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.

Kutzli, I., Zhou, J., Li, T., Baier, S.K., Mezzenga, R. (2023) Formation and characterization of plant-based amyloid fibrils from hemp seed protein. *Food Hydrocolloid.* **137**, 108307.

Kycia, K., Chlebowska-Śmigiel, A., Szydłowska, A., Sokół, E., Ziarno, M., Gniewosz, M. (2020) Pullulan as a potential enhancer of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* viability in synbiotic low fat yoghurt and its sensory quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **128**, 109414.

Lamsaf, H., Singh, S., Pereira, J., Poças, F. (2023) Multifunctional properties of PBAT with hemp (*cannabis sativa*) micronised fibres for food packaging: Cast films and coated paper. *Coatings* **13**, 1195.

Lan, Y., Ohm, J.B., Chen, B., Rao, J. (2020) Phase behavior and complex coacervation of concentrated pea protein isolate-beet pectin solution. *Food Chem.* **307**, 125536.

Lans, C., Turner, N., Khan, T., Brauer, G., Boepple, W. (2007) Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **3**, 11.

Lardos, A. (2006) The botanical materia medica of the Iatrosophikon – a collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *J. Ethnopharmacol.* **104**, 387–406.

Le, H., Wang, X., Wei, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Zhang, L. (2022) Making polyol gummies by 3D printing: effect of polyols on 3D printing characteristics. *Foods*, **11**, 874.

Le, T.A., Guo, Y., Zhou, J.N., Yan, J., Zhang, H., Huynh, T.P. (2022) Synthesis, characterization and biocompatibility of guar gum-benzoic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* **194**, 110-116.

Lee, J., Liu, J., Feng, X., Salazar Hernández, M.A., Mucka, P., Ibi, D., Choi, J.W., Ozcan, U. (2016) Withaferin A is a leptin sensitizer with strong antidiabetic properties in mice. *Nat. Med.* **22**, 1023-1032.

Lee, K.W., Kang, N.J., Kim, J.H., Lee, K.M., Lee, D.E., Hur, H.J., Lee, H.J. (2008) Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes Nutr.* **2**, 319-322.

Lee, S.H., Lee, S.B. (2005) The Hildebrand solubility parameters, cohesive energy densities and internal energies of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based room temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* **27**, 3469–3471.

Lee, S.R., Clardy, J., Senger, D.R., Cao, S., Kim, K.H. (2016) Iridoid and phenylethanoid glycosides from the aerial part of *Barleria lupulina*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **26**, 281-284.

Lele, V., Ruzauskas, M., Zavistanaviciute, P., Laurusiene, R., Rimene, G., Kiudulaite, D., Tomkeviciute, J., Nemeikstyte, J., Stankevicius, R., Bartkiene, E. (2018) Development and characterization of the gummy-supplements, enriched with probiotics and prebiotics. *CyTA - J. Food*, **16**, 580–587.

Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Fang, Z. (2020) Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comp. Rev. Food Sci. F.* **19**, 282–308.

León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A.D., Campos-Montiel, R.G., Aguirre-Álvarez, G. (2019) Hydrolysed collagen from sheepskins as a source of functional peptides with antioxidant activity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3931.

Lepojević, I., Lepojević, Ž., Pavlić, B., Ristić, M., Zeković, Z., Vidović, S. (2017) Solid-liquid and high-pressure (liquid and supercritical carbon dioxide) extraction of *Echinacea purpurea* L. *J. Supercrit. Fluids* **119**, 159-168.

Lev, E. (2007) Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11-14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor–Schechter Genizah collection, Cambridge. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 275–293.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol.* **186**, 464-478.

Leyva-Jiménez, F.J., Lozano-Sánchez, J., Cadiz-Gurrea, M.D.L.L., Fernández-Ochoa, Á., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2020) Spray-drying microencapsulation of bioactive compounds from lemon verbena green extract. *Foods* **9**, 1547.

Li, F.S., Weng, J.K. (2017) Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat. Plants*, **3**, 1-7.

Li, H., Wang, D., Liu, C., Zhu, J., Fan, M., Sun, X., Wang, T., Xu, Y., Cao, Y. (2019) Fabrication of stable zein nanoparticles coated with soluble soybean polysaccharide for encapsulation of quercetin. *Food Hydrocolloid.* **87**, 342-351.

Li, J.J., Ma, S., Wang, Y., Wang, M., Li, M., Gao, C., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Stevanović, Z.D., Tanić, N., Arsenijević, N., Yu, S., Zhu, Q. (2023) *Teucrium montanum* extract drives effector and memory differentiation of CD8⁺ T cells. *Biomed. Res. Ther.* **10**, 6023-6034.

Li, L., Ni, R., Shao, Y., Mao, S. (2014) Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **103**, 1–11.

Li, M., Li, Y., Liu, W., Li, R., Qin, C., Liu, N., Han, J. (2016) The preparation of *Cistanche* phenylethanoid glycosides liquid proliposomes: Optimized formulation, characterization and proliposome dripping pills *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Eur. J Pharm. Sci.* **93**, 224-232.

Li, M., Yu, H., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W. (2021) Fabrication of eugenol loaded gelatin nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. *LWT-Food Sci. Technol.* **139**, 110800.

Li, M.; Xu, T.; Fei, Z.; Wang, M.; Song, H.; Xiao, X.; Lu, B. (2018) Neuroprotective effects of four phenylethanoid glycosides on H₂O₂-induced apoptosis on PC12 Cells via the Nrf2/ARE Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1135.

Li, Q., Liang, W., Lv, L., Fang, Z., Xu, D., Liao, J., Liu, Y. (2024) Preparation of PCL/lecithin/bacteriocin CAMT6 antimicrobial and antioxidant nanofiber films using emulsion electrospinning: Characteristics and application in chilled salmon preservation. *Food Res. Int.* **175**, 113747.

- Li, S., Ma, Y., Ji, T., Sameen, D.E., Ahmed, S., Qin, W., Dai, J., Li, S., Liu, Y. (2020) Cassava starch/carboxymethylcellulose edible films embedded with lactic acid bacteria to extend the shelf life of banana. *Carbohydr. Polym.* **248**, 116805.
- Li, T., Xu, K., Liu, Y. (2018) Anticancer effect of salidroside reduces viability through autophagy/PI3K/Akt and MMP9 signaling pathways in human bladder cancer cells. *Oncol. Lett.* **16**, 3162–3168.
- Li, X., Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Zhang, H. (2009) Rheological study of gum arabic solutions: Interpretation based on molecular self-association. *Food Hydrocolloid.* **23**, 2394–2402.
- Li, X., Gou, C., Yang, H., Qiu, J., Gu, T., Wen, T. (2014) Echinacoside ameliorates D-galactosamine plus lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis and inflammation. *Scand. J. Gastroentero.* **49**, 993–1000.
- Li, Y., Gao, Z., Guo, J., Wang, J., Yang, X. (2022) Modulating aroma release of flavour oil emulsion based on mucoadhesive property of tannic acid. *Food Chem.* **388**, 132970.
- Li, Y., Liu, Y., Liu, R., Liu, S., Zhang, X., Wang, Z., Zhang, J.Y., Lu, J. (2015) HPLC-LTQ-orbitrap MSn profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules. *Anal. Methods* **7**, 7511–7526.
- Li, Y., Zhuang, Y., Tian, W., Sun, L. (2020) *In vivo* acute and subacute toxicities of phenolic extract from rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels by oral administration. *Food Chem.* **320**, 126618.
- Li, Z., Weng, W., Ren, Z., Zhang, Y., Li, S., Shi, L. (2022) Electrospun octenylsuccinylated starch-pullulan nanofiber mats: Adsorption for the odor of oyster peptides and structural characterization. *Food Hydrocolloid.* **133**, 107992.
- Liang, J., Maeda, T., Tao, X.L., Wu, Y.H., Tang, H.J. (2017) Physicochemical properties of *Pueraria* root starches and their effect on the improvement of buckwheat noodle quality. *Cereal Chem.* **94**, 554-559.
- Liao, P.L., Li, C.H., Tse, L.S., Kang, J.J., Cheng, Y.W. (2018) Safety assessment of the *Cistanche tubulosa* health food product Memoregain®: genotoxicity and 28-day repeated dose toxicity test. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 581-588.
- Lim, D. W., Lee, C., Kim, I.H., Kim, Y.T. (2013) Anti-inflammatory effects of total isoflavones from *Pueraria lobata* on cerebral ischemia in rats. *Molecules* **18**, 10404-10412.
- Lim, L.T., Mendes, A.C., Chronakis, I.S. (2019) Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. *Adv. Food Nutr. Res.* **88**, 167-234.
- Lin, L., Fang, H., Li, C., Dai, J., Alharbi, M., Cui, H. (2024) Advancing gelatin/cinnamaldehyde O/W emulsions electrospinnability: Role of soybean lecithin in core-shell nanofiber fabrication. *Food Chem.* **449**, 139305.
- Lin, W.L., Han, Y.X., Liu, F.F., Huang, H., Li, L.H., Yang, S.L., Yanf, X.Q., Wu, Y.Y. (2020) Effect of lipid on surimi gelation properties of the three major Chinese carp. *J. Sci. Food Agric.* **100**, 4671-4677.
- Liu, C., Qin, S., Xie, J., Lin, X., Zheng, Y., Yang, J., Kan, H., Shi, Z. (2021) Using Carboxymethyl cellulose as the additive with enzyme-catalyzed carboxylated starch to prepare

the film with enhanced mechanical and hydrophobic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 638546.

Liu, F., Ma, C., McClements, D. J., Gao, Y. (2017) A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution. *Food Hydrocolloid.* **63**, 625-634.

Liu, M.J., Li, J.X., Guo, H.Z., Lee, K.M., Qin, L., Chan, K.M. (2003) The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Sci.* **73**, 883-892.

Liu, T., Gong, X., Cai, Y., Li, H.Y., Forbes, B. (2024) Pullulan-based spray-dried mucoadhesive microparticles for sustained oromucosal drug delivery. *Pharmaceutics* **16**, 460.

Liu, W., Song, Q., Yan, Y., Liu, Y., Li, P., Wang, Y., Tu, W., Song, Y., Li, J. (2018) Integrated approach for confidence-enhanced quantitative analysis of herbal medicines, *Cistanche salsa* as a case. *J. Chromatogr. A* **1561**, 56-66.

Liu, X., Xue, F., Adhikari, B. (2023) Encapsulation of essential oils using hemp protein isolate–gum Arabic complex coacervates and evaluation of the capsules. *Sustainable Food Technol.* **1**, 426-436.

Liu, X.; Le Bourvellec, C.; Renard, M.G.C.C. (2020) Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**, 3574–3617.

Liu, Z., Ramakrishna, S., Ahmed, I., Rudd, C., Liu, X. (2022) Rheological, surface tension and conductivity insights on the electrospinnability of poly(lactic-co-glycolic acid)-hyaluronic acid solutions and their correlations with the nanofiber morphological characteristics. *Polymers* **14**, 4411.

Liu, Z., Yang, J., Fan, W., Jin, B. (2023) Preparation and quality of okara protein gel gummies. *SN Appl. Sci.* **5**, 139.

Long, Y.Z., Yan, X., Wang, X.X., Zhang, J., Yu, M. (2018) Electrospinning. U: Electrospinning: Nanofabrication and application (Ding, B., Wang, X., Yu, J., ured.). William Andrew Publishing, New York, str. 21-52.

Lopez-Torrez, L., Nigen, M., Williams, P., Doco, T., Sanchez, C. (2015) Acacia senegal vs. Acacia seyal gums–Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloid.* **51**, 41-53.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lu, D., Zhang, J., Yang, Z., Liu, H., Li, S., Wu, B., Ma, Z. (2013) Quantitative analysis of *Cistanches herba* using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods. *J. Sep. Sci.* **36**, 1945–1952.

Lu, J., Xie, L., Wu, A., Wang, X., Liang, Y., Dai, X., Cao, Y., Li, X. (2022) Delivery of silybin using a zein-pullulan nanocomplex: Fabrication, characterization, *in vitro* release properties and antioxidant capacity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **217**, 112682.

- Lu, S., Cik, T.-T., Lii, C.-Y., Lai, P., Chen, H.-H. (2013) Effect of amylose content on structure, texture and α -amylase reactivity of cooked rice. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 224–228.
- Luan, Y., Wang, Q., Li, S., Gu, C., Liu, R., Ge, Q., Yu, H., Wu, M. (2023) Arabic gum grafted with phenolic acid as a novel functional stabilizer for improving the oxidation stability of oil-in-water emulsion. *Food Chem. X* **20**, 100974.
- Lukatsky, A. T. D., Dan, Y., Mizrahi, L., Amir, E. (2024). Hydrogels based on crosslinked polyethylene glycol diacrylate and fish skin gelatin. *Eur. Polym. J.* **210**, 112990.
- Luo, H., Wu, H., Yu, X., Zhang, X., Lu, Y., Fan, J., Tang, L., Wang, Z. (2019) A review of the phytochemistry and pharmacological activities of *Magnoliae officinalis* cortex. *J. Ethnopharmacol.* **233**, 412-442.
- Luo, S., Saadi, A., Fu, K., Taxipalati, M., Deng, L. (2021) Fabrication and characterization of dextran/zein hybrid electrospun fibers with tailored properties for controlled release of curcumin. *J. Sci. Food Agric.* **101**, 6355-6367.
- Luraghi, A., Peri, F., Moroni, L. (2021) Electrospinning for drug delivery applications: A review. *J. Control. Release* **334**, 463-484.
- Ma, J., Xu, C., Yu, H., Feng, Z., Yu, W., Gu, L., Liu, Z., Chen, L., Jiang, Z., Hou, J. (2020) Electro-encapsulation of probiotics in gum arabic-pullulan blend nanofibres using electrospinning technology. *Food Hydrocolloid.* **111**, 106381.
- Ma, L., Cai, J., Miao, J., Gao, H., Zou, L., Liu, W. (2024) Constructing a Novel Oleogel Based on Decrystallization: Enhancing the Loading Efficiency and Bioaccessibility of Curcumin. *Food Bioprocess Tech.* 1-13.
- Ma, Q., Guo, Y., Liu, W., Wang, Z. (2016) Phenylethanoid glycosides from *Houttuynia cordata* and their hepatoprotective activities. *Chem. Nat. Compd.* **52**, 761-763.
- Maccioni, S., Baldini, R., Tebano, M., Cioni, P.L., Flamini, G (2007) Essential oil of *Teucrium scorodonia* L. ssp. *scorodonia* from Italy. *Food Chem.* **104**, 1393–1395.
- Machado, N.D., Fernández, M.A., Häring, M., Saldías, C., Díaz, D. D. (2019) Niosomes encapsulated in biohydrogels for tunable delivery of phytoalexin resveratrol. *RSC Adv.* **9**, 7601-7609.
- Mahdavi, S.A., Jarafi, S.M., Assadpoor, E., Dehnad, D. (2016) Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.* **85**, 379–385.
- Maleki, H., Gharehaghaji, A.A., Criscenti, G., Moroni, L., Dijkstra, P.J. (2015) The influence of process parameters on the properties of electrospun PLLA yarns studied by the response surface methodology. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 41388.
- Malomo, S.A., Aluko, R.E. (2015) A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids* **43**, 743–752.
- Mao, L., Pan, Q., Yuan, F., Gao, Y. (2019) Formation of soy protein isolate carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and *in vitro* digestion. *Food Chem.* **276**, 307–314.

- Mao, Y., Robinson, J., Binner, E. (2021) Understanding heat and mass transfer processes during microwave-assisted and conventional solvent extraction. *Chem. Eng. Sci.* **233**, 1164-18.
- Maqsood, S., Adiamo, O., Ahmad, M., Mudgil, P. (2020) Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food Chem.* **308**, 125522.
- Marchetti, L., Pellati, F., Graziosi, R., Brighenti, V., Pinetti, D., Bertelli, D. (2019) Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. *J. Pharmaceut. Biomed.* **166**, 364-370.
- Mardani, M., Yeganehzad, S., Ptichkina, N., Kodatsky, Y., Kliukina, O., Nepovinnikh, N., Naji-Tabasi, S. (2019) Study on foaming, rheological and thermal properties of gelatin-free marshmallow. *Food Hydrocolloid* **93**, 335-341.
- Martinić, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Žižek, K., Komes, D. (2022) Microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) leaf extract by spray drying. *Food Technol. Biotech.* **60**, 237-252.
- Masters, K. (1997) Spray Dryers. U: *Industrial drying of foods*. (Baker, C.G.J., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 90.
- Matkowski, A., Tasarz P., Szypuła E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plants Res.* **2**, 321-330.
- Matthias, A., Blanchfield, J.T., Penman, K.G, Toth, I., Lang, C.S., De Voss, J.J., Lehmann, R.P. (2004) Permeability studies of alkylamides and caffeic acid conjugates from echinacea using a Caco-2 cell monolayer model. *J. Clin. Pharm. Ther.* **29**, 7-13.
- McCleary, B.V., DeVries, J.W., Rader, J.I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D.C., Okuma, K. (2012) Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **95**, 824-844.
- Menichini, F., Conforti, F., Rigano, D., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F. (2009) Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chem.* **115**, 679–686.
- Menković, N., Šavikin, K., Tasić, S., Zdunić, G., Stešević, D., Milosavljević, S., Vincek, D. (2011) Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains Montenegro. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 97–107.
- Menzies, K.L., Jones, L. (2010) The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry Vision Sci.* **87**(6), 387-399.
- MHLW (1991) Nutrition improvement law enforcement regulations. Ministerial Ordinance No. 41. MHLW - Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare. <<https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>>. Pristupljeno 5. svibnja 2024.
- Michel, J., Abd Rani, N.Z., Husain, K. (2020) A review on the potential use of medicinal plants from Asteraceae and Lamiaceae plant family in cardiovascular diseases. *Front. Pharmacol.* **11**, 852.

- Miller, D.A., Ellenberger, D., Gil, M. (2016) Spray-Drying Technology. U: *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*, 2.izd. (Williams III, R.O., Watts, A.B., Miller, D.A., ured.), Springer, Cham, str. 437-525.
- Milošević-Djordjević, O., Stošić, I., Stanković, M., Grujičić, D. (2013) Comparative study of genotoxicity and antimutagenicity of methanolic extracts from *Teucrium chamaedrys* and *Teucrium montanum* in human lymphocytes using micronucleus assay. *Cytotechnology* **65**, 863–869.
- Mitreski, I., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Stefkov, G., Kulevanova, S. (2014) Polyphenols in representative *Teucrium* species in the fora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSn profile and content. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 175–180.
- Mo, X.M., Xu, C.Y., Kotaki, M.E.A., Ramakrishna, S. (2004) Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* **25**, 1883-1890.
- Moghadam, A., Mobarakeh, M.S., Safaei, M., Kariminia, S. (2021) Synthesis and characterization of novel bio-nanocomposite of polyvinyl alcohol-Gum arabic-magnesium oxide via direct blending method. *Carbohydr. Polym.* **260**, 117802.
- Molaveisi, M., Taheri, R.A., Dehnad, D. (2022) Innovative application of the *Echinacea purpurea* (L.) extract - phospholipid phytosomes embedded within *Alyssum homolocarpum* seed gum film for enhancing the shelf life of chicken meat. *Food Biosci.* **50**, 102020.
- Moridani, M.Y., Scobie, H., O'Brien, P.J. (2002) Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol. Lett.* **133**, 141-151.
- Mosaddegh, M., Naghibi, F., Moazzeni, H., Pirani, A., Esmaeili, S. (2012) Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. *J. Ethnopharmacol.* **141**, 80–95.
- Muala, W.C.B., Desobgo, Z.S.C., Jong, N.E. (2021) Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. *Heliyon* **7**, e06744.
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S. (2012) X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 1035–1039.
- Mudgil, D., Barak, S., Patel, A., Shah, N. (2018) Partially hydrolyzed guar gum as a potential prebiotic source. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**, 207-210.
- Mulani, S.K., Guh, J. H., Mong, K.K.T. (2014) A general synthetic strategy and the anti-proliferation properties on prostate cancer cell lines for natural phenylethanoid glycosides. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 2926-2937.
- Mustafa, B., Hajdari, A., Krasniqi, F., Hoxha, E., Ademi, H., Quave, C.L., Pieroni, A. (2012) Medical ethnobotany of the Albanian Alps in Kosovo. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **8**, 6.
- Myagmar, B. E., Aniya, Y. (2000) Free radical scavenging action of medicinal herbs from Mongolia. *Phytomedicine* **7**, 221-229.
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I. (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* **20**, 33-43.

- Naczka, M., Grant, S., Zadernowski, R., Barre, E. (2006) Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chem.* **96**, 640-647.
- Nadeem, H., Dehghani, M., Miri, S., Pazirofteh, M., Garnier, G., Batchelor, W. (2023) Highly hydrophobic and moisture barrier nanocellulose based films produced via spray deposition. *Cellulose* **30**, 5157–5170.
- Nastić, N., Švarc-Gajića, J., Delerue-Matos, C., Morais, S., Barroso, M.F., Soares, C., Moreira, M.M. (2018) Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J. Supercrit. Fluid* **138**, 200–206.
- NATCM (2020) Diagnosis and treatment protocol for novel coronavirus pneumonia (Trial Version 7). NATCM - National Administration of Traditional Chinese Medicine, Peking.
- Nedelcheva, A., Pieroni, A., Dogan, Y. (2017) Folk food and medicinal botanical knowledge among the last remaining Yörüks of the Balkans. *Acta. Soc. Bot. Pol.* **86**, 3522.
- Neeharika, T.S.V.R., Anjaneyulu, B., Rani, K.N.P., Sandeepa, K., Satyannarayana, S. (2024) Mathematical modelling for sustainable extraction of oil from rice bran, safflower seeds and flaxseeds employing supercritical carbon dioxide at pilot scale: An insight to comprehensive physico-chemical analysis. *Sep. Purif. Technol.* **342**, 127007.
- Neri-Numa, I.A., DellaTorre, A., Oriani, V.B., Franch, G.C., Angolini, C.F.F., Hubinger, M.D., Ruiz, A.L.T.G., Pastore, G.M. (2020) *In vitro* bioactivity approach of unripe genipap (*Genipa americana* L., Rubiaceae) fruit extract and its solid lipid microparticle. *Food Res. Int.* **127**, 108720.
- Neuss, N., Gorman, M., Svoboda, G.H., Maciak, G., Beer, C.T. (1959) Vinca alkaloids. III. ¹ Characterization of leurosine and vincalkebostine, new alkaloids from *Vinca Rosea* Linn. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4754–4755.
- Nguyen, Q.D., Dang, T.T., Nguyen, T.V.L., Nguyen, T.T.D., Nguyen, N.N. (2022) Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: Effects of different carriers on selected physicochemical properties and antioxidant activities of spray-dried and freeze-dried powder. *Int. J. Food Prop.* **25**, 359-374.
- Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., van Den Eijnden, P., Henket, J.T., Langelaan, M.L., Stroeks, N., van Deventer, H., Martin, A.H. (2014) Reprint of "Food-grade electrospinning of proteins". *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **24** 138-144.
- Nikodijević, D., Milutinović, M., Cvetković, D., Stanković, M., Živanović, M., Marković, S. (2016) Effects of *Teucrium polium* L. and *Teucrium montanum* L. extracts on mechanisms of apoptosis in breast and colon cancer cells. *Kragujevac J. Sci.* **38**, 147–159.
- Nishimura, H., Sasaki, H., Inagaki, N., Chin, M., Zhengxiong, C., Mitsuhashi, H. (1991) Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys Sieboldii*. *Phytochemistry* **30**, 965–969.
- NithyaBalaSundari, S., Nivedita, V., Chakravarthy, M., Srisowmeya, G., Antony, U., Dev, G.N. (2020) Characterization of microbial polysaccharides and prebiotic enrichment of wheat bread with pullulan. *LWT-Food Sci. Technol.* **122**, 109002.
- Niu, B., Shao, P., Chen, H., Sun, P. (2019) Structural and physicochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation. *Carbohydr. Polym.* **208**, 276-284.

Niu, D., Zhang, M., Tang, T., Mujumdar, A.S., & Li, J. (2023) Investigation of 3D printing of children starch gummies with precise and special shape based on change of model parameters. *J. Food Eng.* **356**, 111568.

Oalđe, M.M., Kolarević, S.M., Živković, J.C., Vuković-Gačić, B.S., Marić, J.M.J., Kolarević, M.J.K., Đorđević, J., Matin, P.D., Šavikin, K., Vuković – Gačić, B., Duletić-Laušević, S.N. (2020) The impact of different extracts of six Lamiaceae species on deleterious effects of oxidative stress assessed in acellular, prokaryotic and eukaryotic models *in vitro*. *Saudi Pharm. J.* **28**, 1592-1604.

Oertzen-Hagemann, V., Kirmse, M., Eggers, B., Pfeiffer, K., Marcus, K., de Marées, M., Platen, P. (2019) Effects of 12 weeks of hypertrophy resistance exercise training combined with collagen peptide supplementation on the skeletal muscle proteome in recreationally active men. *Nutrients* **11**, 1072.

Oganessian, G.B., Galstyan, A.M., Mnatsakanyan, V.A., Shashkov, A.S., Agababyan, R.V. (1991) Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Chem. Nat. Compd.* **27**, 556–559.

Ogrodowska, D., Laaksonen, O., Tańska, M., Konopka, I., Linderborg, K.M. (2020) Pumpkin oil addition and encapsulation process as methods to improve oxidative stability of fish oil. *LWT-Food Sci. Technol.* **124**, 109–142.

Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H. (2014) Health foods and foods with health claims in Japan. U: *Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world*, 2. izd., (Bagchi, D., ured.), Academic Press, Oxford, str. 265–299.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.

Okutan, N., Terzi, P., Altay, F. (2014) Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloid.* **39**, 19–26.

Oliveira, F.M., Oliveira, R.M., Buchweitz, L.T.G., Pereira, J.R., dos Santos Hackbart, H.C., Nalério, É.S., Borges, C.D., Zambiasi, R.C. (2022) Encapsulation of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) in gelatin/tragacanth gum by complex coacervation for application in sheep meat hamburger. *Food Control* **131**, 108426.

Orio, L. P., Boschini, G., Recca, T., Morelli, C.F., Ragona, L., Francescato, P., Arnoldi, A., Speranza, G. (2017) New ACE-inhibitory peptides from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins. *J. Agr. Food Chem.* **65**, 10482–10488.

Otálora, M.C., Barbosa, H.D.J., Perilla, J.E., Osorio, C.; Nazareno, M.A. (2019) Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *LWT-Food Sci. Technol.* **103**, 222–227.

Özdemir, E., Alpınar, K. (2015) An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde–Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **166**, 53-65.

Padmore, J.M. (1990a) Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.

Padmore, J.M. (1990b) Animal feed - AOAC official method 976.05 - Protein (crude) in animal feed, automated Kjeldhal method. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich,

K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 72.

Padmore, J.M. (1990c) Animal feed - AOAC official method 920.39 - Fat (crude) or ether extract in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 79.

Padmore, J.M. (1990d) Animal feed - AOAC official method 942.05 - Ash of animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 70.

Paksoy, M.Y., Selvi, S., Savran, A. (2016) Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Ulukışla (Niğde-Turkey). *J. Herb. Med.* **6**, 42-48.

Palzer, S. (2009) Influence of material properties on the agglomeration of water-soluble amorphous particles. *Powder Technol.* **189**, 318-326.

Palzer, S. (2011) Agglomeration of pharmaceutical, detergent, chemical and food powders-similarities and differences of materials and processes. *Powder Technol.* **206**, 2-17.

Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2004) Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography - negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3679–3687.

Parvaneh, S., Pourmadadi, M., Abdouss, M., Pourmousavi, S.A., Yazdian, F., Rahdar, A., Díez-Pascual, A.M. (2023) Carboxymethyl cellulose/starch/reduced graphene oxide composite as a pH-sensitive nanocarrier for curcumin drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **241**, 124566.

Pascoli, M., de Lima, R., Fraceto, L.F. (2018) Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Front. Chem.* **6**, 6.

Paternina, L.P.R., Moraes, L., Santos, T.D., de Morais, M.G., Costa, J.A.V. (2022) Spirulina and açai as innovative ingredients in the development of gummy candies. *J. Food Process Pres.* **46**, e17261.

Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., Hoyer, D. (2015) An analysis of FDA approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* **21**, 204–207.

Pavela, R., Benelli, G., Canale, A., Maggi, F., Mártonfi, P. (2020) Exploring essential oils of Slovak medicinal plants for insecticidal activity: The case of *Thymus alternans* and *Teucrium montanum* subsp. *jailae*. *Food Chem. Toxicol.* **138**, 111203.

Pavlova, D., Karadjova, I. (2012) Chemical analysis of *Teucrium* species (Lamiaceae) growing on serpentine soils in Bulgaria. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* **175**, 891-899.

Pedras, B.M., Regalin, G., Sa-Nogueira, I., Simoes, P., Paiva, A., Barreiros, S. (2020) Fractionation of red wine grape pomace by subcritical water extraction/hydrolysis. *J. Supercrit. Fluids* **160**, 104793.

Pereira, D.G., Benassi, M.D.T., Beleia, A.D.P. (2022) Gummy candies produced with acid-thinned cassava starch: Physical and sensory evaluation. *J. Food Process Pres.* **46**, e16661.

Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storey, K.B., Lushchak, O. (2021) Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI J*, **20**, 1412.

- Piao, Y., Liu, Y., Xie, X. (2013) Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. *J. Toxicol. Pathol.* **26**, 29-34.
- Piątczak, E., Kuźma, Ł., Skała, E., Żebrowska, M., Balcerczak, E., Wysokińska, H. (2015) Iridoid and phenylethanoid glycoside production and phenotypical changes in plants regenerated from hairy roots of *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **122**, 259-266.
- Pieroni, A. (2008) Local plant resources in the ethnobotany of Theth, a village in the Northern Albanian Alps. *Genet. Resour. Crop. Ev.* **8**, 1197–1214.
- Pieroni, A., Quave, C.L. (2005) Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: a comparison. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 258–270.
- Pieroni, A., Quave, C.L., Santoro, R.F. (2004) Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *J. Ethnopharmacol.* **95**, 373–384.
- Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y.E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., du Toit, L.C., Ndesendo, V. M. (2013) A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *J. Nanomater.* **2013**, 789289.
- Pinto, D., Vieira, E.F., Peixoto, A.F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue – Matos, C., Rodrigues, F. (2021) Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chem.* **334**, 127521.
- Plati, F., Paraskevopoulou, A. (2023) Hemp protein isolate–gum Arabic complex coacervates as a means for oregano essential oil encapsulation. Comparison with whey protein isolate–gum Arabic system. *Food Hydrocolloid.* **136**, 108284.
- Plati, F., Ritzoulis, C., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. (2021) Complex coacervate formation between hemp protein isolate and gum Arabic: Formulation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **182**, 144–153.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M.D., Ibañez, E., Herrero, M. (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Res. Int.* **43**, 2341–2348.
- Plaza, M., Turner, C. (2015) Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trend Anal. Chem.* **71**, 39–54.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. (2018) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **6** 10-1128.
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Satil, F. (2013) Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl – Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **148**, 951–963.
- Poncelet, D. (2006) Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. U: *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science* (Blitz, J.P., Gun'ko, V.M., ured.), Springer, Dordrecht, str. 23-34.
- Porfirio, T., Galindo-Rosales, F.J., Campo-Deano, L., Vicente, J., Semiao, V. (2021) Rheological characterization of polymeric solutions used in spray drying process. *Eur. J. Pharm. Sci.* **158**, 105650.
- Poudel, D., Swilley-Sanchez, S., O'keefe, S., Matson, J., Long, T., Fernández-Fraguas, C. (2020) Novel electrospun pullulan fibers incorporating hydroxypropyl- β -cyclodextrin: morphology and relation with rheological properties. *Polymers* **12**, 2558.

Pravilnik o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima (2005) *Narodne Novine* **1442**, Zagreb.

Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (2013) *Narodne novine* **55**, Zagreb.

Priya, G., Madhan, B., Narendrakumar, U., Suresh Kumar, R.V., Manjubala, I. (2021) *In vitro* and *in vivo* evaluation of carboxymethyl cellulose scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Omega* **6**, 1246-1253.

Prucoli, L., Nicolini, B., Lianza, M., Teti, G., Falconi, M., Tarozzi, A., Antognoni, F. (2024) Antioxidant and anti-melanogenesis effects of *Teucrium chamaedrys* L. cell suspension extract and its main phenylethanoid glycoside in B16-F10 cells. *Plants* **13**, 808.

Putra, N.R., Rizkiyah, D.N., Idham, Z., Veza, I., Qomariyah, L., Yunus, M.A.C. (2022) Optimization and modelling in flavonoid and phenolic compounds recovery from peanut skin by subcritical water. *Biomass Convers. Bior.* 1-11.

Qayum, A., Rashid, A., Liang, Q., Kang, L., Ahmed, Z., Hussain, M., Virk, M.S., Ekumah, J.N., Ren, X., Ma, H., Miao, S. (2024) Multi-scale ultrasound induced composite coacervates of whey protein and pullulan polysaccharide on emulsion forming and stabilizing mechanisms. *Colloid Surface B* **234**, 113709.

Qian, H., Lu, D., Li, W., Zhou, X., Wu, B., Ma, Z. (2016) Validated UPLC/Q-TOF-MS method for determination of poliumoside in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Am. J. Anal. Chem.* **7**, 266-274.

Qian, Y., Qi, M., Zheng, L., King, M. W., Lv, L., Ye, F. (2016) Incorporation of rutin in electrospun pullulan/PVA nanofibers for novel UV-resistant properties. *Materials* **9**, 504.

Qin, Z.Y., Jia, X.W., Liu, Q., Kong, B.H., Wang, H. (2019) Fast dissolving oral films for drug delivery prepared from chitosan/pullulan electrospinning nanofibers. *Int. J. Biol. Macromol.* **137**, 224-231.

Qiu, L., Zhang, M., Ghazal, A. F., Chu, Z., Luo, Z. (2024) Development of 3D printed k-carrageenan-based gummy candies modified by fenugreek gum: Correlating 3D printing performance with sol-gel transition. *Int. J. Biol. Macromol.* **265**, 130865.

Radulović, N., Dekić, M., Joksović, M., Vukićević, R. (2012) Chemotaxonomy of Serbian *Teucrium* species inferred from essential oil chemical composition: the case of *Teucrium scordium* L. ssp. *scordioides*. *Chem. Biodivers.* **9**, 106-122.

Radünz, M., Camargo, T.M., dos Santos Hackbart, H.C., Blank, J.P., Hoffmann, J.F., Stefanello, F.M., da Rosa Zavareze, E. (2021) Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. *Food Chem.* **339**, 128075.

Rahman, S., Konwar, A., Majumdar, G., Chowdhury, D. (2021) Guar gum-chitosan composite film as excellent material for packaging application. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2**, 100158.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Lim, T.C., Ma, Z. (2005) An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur.

Râpă, M., Gaidau, C., Mititelu-Tartau, L., Berechet, M.D., Berbecaru, A.C., Rosca, I., Chiriac, A.P., Matei, E., Predescu, A.M., Predescu, C. (2021) Bioactive collagen hydrolysate-

chitosan/essential oil electrospun nanofibers designed for medical wound dressings. *Pharmaceutics* **13**, 1939.

Rashid, M.H., Uddin, M.N., Asaeda, T., Robinson, R.W. (2017) Seasonal variations of carbohydrates in *Pueraria lobata* related to growth and phenology. *Weed Biol. Manag.* **17**, 103-111.

Ravber, M., Knez, Ž., Škerget, M. (2015) Optimization of hydrolysis of rutin in subcritical water using response surface methodology. *J. Supercrit. Fluids* **104**, 145-152.

Rawat, S., Rai, S., Sangeeta, S., Kumar, A., Ramachandran, P., Sharma, S. K., Dubey, S.K., Prakash, A., Joshi, R. (2024) Application of plant-based hydrocolloids on the textural profile of vegan gummies supplemented with turmeric and black pepper. *Int. J. Food Sci.* **2024**, 7127635.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231-1237.

Redžić, S. (2007) The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Collegium Antropol.* **31**, 869–890.

Redžić, S. (2010) Wild medicinal plants and their usage in traditional human therapy (Southern Bosnia and Herzegovina, W. Balkan). *J. Med. Plant. Res.* **4**, 1003–1027.

Remígio, M.S.D.N., Greco, T., Silva Júnior, J.O.C., Converti, A., Ribeiro-Costa, R. M., Rossi, A., Barbosa, W.L.R. (2024) Spray-drying microencapsulation of *Bauhinia unguolata* L. var. *obtusifolia* aqueous extract containing phenolic compounds: A comparative study using different wall materials. *Pharmaceutics* **16**, 488.

Ren, G., He, Y., Lv, J., Zhu, Y., Xue, Z., Zhan, Y., Sun, Y., Luo, X., Li, T., Song, Y., Niu, F., Huang, M., Fang, S., Fu, L., Xie, H. (2023) Highly biologically active and pH-sensitive collagen hydrolysate-chitosan film loaded with red cabbage extracts realizing dynamic visualization and preservation of shrimp freshness. *Int. J. Biol. Macromol.* **233**, 123414.

Ren, G., Shi, J., Huang, S., Liu, C., Ni, F., He, Y., Luo, X., Li, T., Song, Y., Huang, M., Xie, H. (2022) The fabrication of novel zein and resveratrol covalent conjugates: Enhanced thermal stability, emulsifying and antioxidant properties. *Food Chem.* **374**, 131612.

Renaldi, G., Junsara, K., Jannu, T., Sirinupong, N., Samakradhamrongthai, R. S. (2022) Physicochemical, textural, and sensory qualities of pectin/gelatin gummy jelly incorporated with *Garcinia atroviridis* and its consumer acceptability. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **28**, 100505.

Reneker D.H., A.L. Yarin, H. Fong, S. Koombhongse (2000) Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J. Appl. Phys.* **87**, 4531–4547.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–1131.

Rezaeinia, H., Farahmand, A., Emadzadeh, B., Hosseini-Isfahani, M., Ghorani, B. (2024) Role of cyclodextrin inclusion complexes assembled in the fast-dissolving structures of electrospun gelatin mats to extend the release of menthol. *Food Hydrocolloid.* **154**, 110151.

Rezende, Y.R.R.S., Nogueira, J. P., Narain, N. (2018) Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by

spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chem.* **254**, 281-291.

Ribeiro, A.M., Estevinho, B.N., Rocha, F. (2019) Spray drying encapsulation of elderberry extract and evaluating the release and stability of phenolic compounds in encapsulated powders. *Food Bioprocess Tech.* **12**, 1381-1394.

Rigolon, T.C.B., Silva, R.R.A., de Oliveira, T.V., Nascimento, A.L.A.A., de Barros, F.A.R., Martins, E., Campelo, P.H. and Stringheta, P.C. (2024) Exploring anthocyanins-polysaccharide synergies in microcapsule wall materials via spray drying: Interaction characterization and evaluation of particle stability. *Measurement: Food* **13**, 100126.

Roberts, K. (2011) The physiological and rheological effects of foods supplemented with guar gum. *Food Res. Int.* **44**, 1109–1.

Rodrigues, M.Á.V., Bertolo, M.R.V., Marangon, C.A., Martins, V.D.C.A., de Guzzi Plepis, A.M. (2020) Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **160**, 769-779.

Romanchik-Cerpovicz, J., Ingram, C., Rosser, A. (2020) Effect of milk fat on the physical and sensory properties of vanilla puddings prepared with kudzu starch compared to cornstarch. *J Acad. Nutr. Diet.* **120**, A50.

Rošic, R., Pelipenko, J., Kocbek, P., Baumgartner, S., Bešter-Rogač, M., Kristl, J. (2012) The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *Eur. Polym. J.* **48**, 1374-1384.

Ross, Y.H. (2008) The glassy state. U: *Food Materials Science: Principles and Practice* (Lillford, P., Aguilera, J.M., ured.), Springer: New York, str. 67–81.

Rousi, Z., Malhiac, C., Fatouros, D.G., Paraskevopoulou, A. (2019) Complex coacervates formation between gelatin and gum Arabic with different arabinogalactan protein fraction content and their characterization. *Food Hydrocolloid.* **96**, 577-588.

Rubinstein, M., Colby, R.H. (2003). *Polymer physics*. Oxford university press.

Rushing, T.S., Hester, R.D. (2003) Intrinsic viscosity dependence on polymer molecular weight and fluid temperature. *J. Appl. Polym. Sci.* **89**, 2831-2835.

Russo, R., Reggiani, R. (2015) Evaluation of protein concentration, amino acid profile and antinutritional compounds in hempseed meal from dioecious and monoecious varieties. *Am. J. Plant Sci.* **6**, 14–22.

Rutledge, G.C., Fridrikh, S.V. (2007) Formation of fibers by electrospinning. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **59**, 1384-1391.

Saad, J.S., Dia, V.P. (2023) Bromelain hydrolysis modified the functionality, antioxidant, and anti-inflammatory properties of hempseed (*Cannabis sativa* L.) protein isolated at pH 12. *ACS Food Sci. Technol.* **3**, 1049-1056.

Safa, O., Soltanipoor, M. A., Rastegar, S., Kazemi, M., Dehkordi, K. N., Ghannadi, A. (2013) An ethnobotanical survey on hormozgan province, Iran. *Avicenna J. Phytomed.* **3**, 64.

Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H. (2002) Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *J. Ethnopharmacol.* **83**, 251–265.

- Sailović, P., Odžaković, B., Bodroža, D., Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., Zvezdanović, J., Danilović, B. (2024) Polyphenolic composition and antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and antihyperglycemic activity of different extracts of *Teucrium montanum* from Ozren Mountain. *Antibiotics* **13**, 358.
- Saint-Eve, A., Déléris, I., Panouillé, M., Dakowski, F., Cordelle, S., Schlich, P., Souchon, I. (2011) How texture influences aroma and taste perception over time in candies. *Chemosens. Percept.* **4**, 32–41.
- Sakulnarmrat, K., Konczak, I. (2023) Encapsulation of *Melodorum fruticosum* Lour. anthocyanin-rich extract and its incorporation into model food. *LWT-Food Sci. Technol.* **153**, 112546.
- Salama, H.H., Hashim, A.F. (2022) A functional spreadable canola and milk proteins oleogels as a healthy system for candy gummies. *Sci. Rep.* **12**, 12619.
- Salgado, A.M., Ozturk, O.K., Hamaker, B.R., Campanella, O.H. (2023) Matching textural properties of commercial meat and cheese products using zein as the viscoelastic agent and calcium hydroxide as the textural modifier in plant-based formulations. *Food Hydrocolloid.* **137**, 108323.
- Samaei, S.P., Martini, S., Tagliazucchi, D., Gianotti, A., Babini, E. (2021) Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from alcalase protein hydrolysate fractions of hemp (*Cannabis sativa* L.) bran. *J. Agri. Food Chem.* **69**, 9220-9228.
- Samochocki, M., Höfle, A., Fehrenbacher, A., Jostock, R., Ludwig, J., Christner, C., Radina, M., Zerlin, M., Ullmer, C., Pereira, E.F.R., Lübbert, H., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. (2003) Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 1024-1036.
- Santana, R.C., Perrechil, F.A., Sato, A.C.K., Cunha, R.L. (2011) Emulsifying properties of collagen fibers: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure. *Food Hydrocolloid.* **25**, 604-612.
- Santos-Cruz, L.F., Ávila-Acevedo, J.G., Ortega-Capitaine, D., Ojeda-Duplancher, J.C., Perdigón-Moya, J.L., Hernández-Portilla, L.B., López-Dionicio, H., Durán-Díaz, A., Dueñas-García, I.E., Castañeda-Partida, L., García-Bores, A.M., Heres-Pulido, M.E., Heres-Pulido, M. E. (2012) Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1082-1090.
- Sargin, S.A. (2015) Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **173**, 105–126.
- Sarrate, R., Ticó, J. R., Miñarro, M., Carrillo, C., Fàbregas, A., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Suñé-Negre, J. M. (2015) Modification of the morphology and particle size of pharmaceutical excipients by spray drying technique. *Powder Technol.* **270**, 244-255.
- Sato, K. (2017) The presence of food-derived collagen peptides in human boy-structure and biological activity. *Food Funct.* **8**, 12.
- Savić, J., Mačukanović-Jocić, M., Jarić, S. (2019) Medical ethnobotany on the Javor Mountain (Bosnia and Herzegovina). *Eur. J. Intern. Med.* **27**, 52–64.

Scarpati, M.L., Monache, F. (1963) Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Ann. Chim.* **53**, 356-367.

Seethu, B.G., Pushpadass, H.A., Emerald, F.M.E., Nath, B.S., Naik, N.L., Subramanian, K.S. (2020) Electrohydrodynamic encapsulation of resveratrol using food-grade nanofibres: process optimization, characterization and fortification. *Food Bioproc. Technol.* **13**, 341–354.

Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001) Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.* **75**, 95–115.

Sganzerla, W.G., Ribeiro, C.P.P., Uliana, N.R., Rodrigues, M.B.C., da Rosa, C.G., Ferrareze, J.P., Veeck, A.P.D.L., Nunes, M.R. (2021) Bioactive and pH-sensitive films based on carboxymethyl cellulose and blackberry (*Morus nigra* L.) anthocyanin-rich extract: A perspective coating material to improve the shelf life of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **33**, 101989.

Sghaier, M. B., Harizi, H., Louhichi, T., Krifa, M., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2011a) Anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of leaf extracts and sesquiterpene from *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae). *Immunopharm. Immunot.* **33**, 656-662.

Sghaier, M. B., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M. G. D., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. (2011b) Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environ. Toxicol. Phar.* **32**, 336-348.

Shah, R., Stodulka, P., Skopalova, K., Saha, P. (2019) Dual crosslinked collagen/ chitosan film for potential biomedical applications. *Polymers* **11**, 2094.

Shahbazi, M., Rajabzadeh, G., Ettelaie, R., Rafe, A. (2016) Kinetic study of κ -carrageenan degradation and its impact on mechanical and structural properties of chitosan/ κ -carrageenan film. *Carbohydr. Polym.* **142**, 167-176.

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.

Shao, X., Niu, B., Fang, X., Wu, W., Liu, R., Mu, H., Gao, H., Chen, H. (2023) Pullulan-stabilized soybean phospholipids/cinnamaldehyde emulsion for *Flammulina velutipes* preservation. *Int. J. Biol. Macromol.* **246**, 125425.

Sharkawy, A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A.E. (2019) Preparation of chitosan/gum Arabic nanoparticles and their use as novel stabilizers in oil/water Pickering emulsions. *Carbohydr. Polym.* **224**, 115190.

Sharma, S., Malhotra, L., Yadav, P., Mishra, V., Sharma, R. S., Samath, E. A. (2022) Genistein: A novel inhibitor of IL-6/IL-6R interface of the Interleukin-6–mediated STAT3 dependent pathway of carcinogenesis. *J. Mol. Struct.* **1258**, 132668.

Shawahna, R., Jaradat, N.A. (2017) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by patients with psoriasis in the West Bank of Palestine. *BMC Complem. Altern. Med.* **17**, 4.

- Shen, J.Y., Yang, X.L., Yang, Z.L., Kou, J.P., Li, F. (2015) Enhancement of absorption and bioavailability of echinacoside by verapamil or clove oil. *Drug Des. Dev. Ther.* **9**, 4685-4693.
- Shi, C., Ma, Y., Tian, L., Li, J., Qiao, G., Liu, C., Cao, W., Liang, C. (2022) Verbascoside: an efficient and safe natural antibacterial adjuvant for preventing bacterial contamination of fresh meat. *Molecules* **27**, 4943.
- Shi, M., He, W., Liu, Y., Li, X., Yang, S., Xu, Q. (2013) Protective effect of total phenylethanoid glycosides from *Monochasma savatieri* Franch on myocardial ischemia injury. *Phytomedicine* **20**, 1251-1255.
- Shishir, M.R., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci. Tech.* **78**, 34-60.
- Shtukmaster, A., Ljubuncic, P., Bomzon A (2010) The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis *in vitro*: a possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2010**, 938324.
- Shukla, R., Cheryan, M. (2001) Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crops Prod.* **13**, 171-192.
- Si, X., Ma, X., Wang, Y., Li, Y., Liu, L., Yang, Y., Guo, Z., Liang, Y., Pan, G. (2023) Efficacy and safety of Jinhua Qinggan granules in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Medicine* **102**, 33545.
- Siddig, N.E., Osman, M.E., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. (2005) Studies on acacia exudate gums, part IV. Distribution of molecular components in *Acacia seyal* in relation to *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloid.* **19**, 679–686.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *CSH Perspect. Biol.* **2**, 000414.
- Silveira, L.R., Pereira-Da-Silva, L., Juel, C., Hellsten, Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radical Bio. Med.* **35**, 455–464.
- Silveira, M.P., Almeida, F.L.C., Alvim, I.D., Prata, A.S. (2023) Encapsulation of pomegranate polyphenols by ionic gelation: Strategies for improved retention and controlled release. *Food Res. Int.* **174**, 113590.
- Singh, A., Van den Mooter, G. (2016) Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv. Drug Deliver Rev.* **100**, 27-50.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.
- Singh, R.S., Kaur, N., Hassan, M., Kennedy, J.F. (2021) Pullulan in biomedical research and development-A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **166**, 694-706.
- Singh, R.S., Kaur, N., Rana, V., Kennedy, J.F. (2017) Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **171**, 102-121.
- Singh, R.S., Kaur, N., Singh, D., Kennedy, J.F. (2019) Investigating aqueous phase separation of pullulan from *Aureobasidium pullulans* and its characterization. *Carbohydr. Polym.* **223**, 115103.

Singh, R.S., Saini, G.K., Kennedy, J.F. (2021) Pullulan production in stirred tank reactor by a colour-variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2**, 100086.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *AJEV* **16**, 144-158.

Skalski, B., Pawelec, S., Jedrejek, D., Rolnik, A., Pietukhov, R., Piwowarczyk, R., Stochmal, A., Olas, B. (2021) Antioxidant and anticoagulant effects of phenylpropanoid glycosides isolated from broomrapes (*Orobanchaceae*, *Phelipanche arenaria*, and *P. ramosa*). *Biomed. Pharmacother.* **139**, 111618.

Son, E., Yoon, J.M., An, B.J., Lee, Y.M., Cha, J., Chi, G.Y., Kim, D.S. (2019) Comparison among activities and isoflavonoids from *Pueraria thunbergiana* aerial parts and root. *Molecules* **24**, 912.

Song, X., Chiou, B. S., Xia, Y., Chen, M., Liu, F., Zhong, F. (2022) The improvement of texture properties and storage stability for kappa carrageenan in developing vegan gummy candies. *J. Sci. Food Agr.* **102**, 3693-3702.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **579**, 200-213.

Souza, F.N., Gebara, C., Ribeiro, M.C., Chaves, K.S., Gigante, M.L., Grosso, C.R. (2012) Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Res. Int.* **49**, 560–566.

Spence, J.T. (2006) Challenges related to the composition of functional foods. *J. Food. Compos. Anal.* **19**, 4-6.

Sriwidodo, S., Pratama, R., Umar, A.K., Chaerunisa, A.Y., Ambarwati, A.T., Wathoni, N. (2022) Preparation of mangosteen peel extract microcapsules by fluidized bed spray-drying for tableting: improving the solubility and antioxidant stability. *Antioxidants* **11**, 1331.

Stanković, M.S. (2012a) Biological effects of secondary metabolites of *Teucrium* species of Serbian flora. Doktorska disertacija. Sveučilište u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija.

Stanković, M.S., Ćurčić, M., Žižić, J., Topuzović, M., Solujić, S., Marković, S. (2011a) *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 4190–4205.

Stanković, M.S., Martinović, N., Topuzović, M.D, Solujić, S. (2011b) Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **25**, 2222-2227.

Stanković, M.S., Mitrović, T.L., Matić, I.Z., Topuzović, M.D., Stamenković, S.M. (2015) New values of *Teucrium* species: *In vitro* study of cytotoxic activities of secondary metabolites. *Not. Bot. Horti Agrobi.* **43**, 41-46.

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

Stephansen, K., García-Díaz, M., Jessen, F., Chronakis, I.S., Nielsen, H.M. (2016). Interactions between surfactants in solution and electrospun protein Fibers: Effects on release behavior and fiber properties. *Mol. Pharmaceutics* **13**, 748-755.

Stojković, D., Gašić, U., Drakulić, D., Zengin, G., Stevanović, M., Rajčević, N., Soković, M. (2021) Chemical profiling, antimicrobial, anti-enzymatic, and cytotoxic properties of *Phlomis fruticosa* L. *J. Pharmaceut. Biomed.* **195**, 113884.

Stoll, A., Renz, J., Brack, A. (1950) Isolation and constitution of echinacoside, a glycoside from the roots of *Echinacea angustifolia* DC. *Helv. Chim. Acta*, **33**, 16.

Subrahmanya, T.M., Arshad, A.B., Lin, P.T., Widakdo, J., Makari, H.K., Austria, H. F. M., Hu, C.C., Lai, J.Y., Hung, W.S. (2021) A review of recent progress in polymeric electrospun nanofiber membranes in addressing safe water global issues. *RSC Adv.* **11**, 9638-9663.

Suhag, Y., Nayik, G.A., Nanda, V. (2016) Effect of gum arabic concentration and inlet temperature during spray drying on physical and antioxidant properties of honey powder. *J. Food Meas. Charact.* **10**, 350-356.

Sun, J., Chen, L., Jiang, P., Duan, B., Wang, R., Xu, J., Liu, W., Xu, Y., Xie, Z., Feng, F., Qu, W. (2020) Phenylethanoid glycosides of *Callicarpa kwangtungensis* Chun exert cardioprotective effect by weakening Na⁺-K⁺-ATPase/Src/ERK1/2 pathway and inhibiting apoptosis mediated by oxidative stress and inflammation. *J. Ethnopharmacol.* **258**, 112881.

Sun, R., Deng, X., Zhang, D., Xie, F., Wang, D., Wang, J., Tavallaie, M. S., Jiang, F., Fu, L. (2019) Anti-diabetic potential of *Pueraria lobata* root extract through promoting insulin signaling by PTP1B inhibition. *Bioorg. Chem.* **87**, 12-15.

Sun, X. M., Wang, C. N., Guo, M. R. (2018) Interactions between whey protein or polymerized whey protein and soybean lecithin in model system. *J. Dairy Sci.* **101**, 9680-9692.

Sun, Y., Guo, F., Peng, X., Cheng, K., Xiao, L., Zhang, H., Li, H., Jiang, L., Deng, Z. (2021) Metabolism of phenolics of *Tetragium hemsleyanum* roots under *in vitro* digestion and colonic fermentation as well as their *in vivo* antioxidant activity in rats. *Foods* **10**, 2123.

Svihus, B., Uhlen, A.K., Harstad, O.M. (2005) Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **122**, 303-320.

Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J. (2011) Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 1051–1076.

Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J. (2010b) Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* **131**, 33–55.

Šarić-Kundalić, B., Fritz, E., Dobeš, C., Saukel, J. (2010a) Traditional medicine in the pristine village of Prokoško lake on Vranica Mountain, Bosnia and Herzegovina. *Sci. Pharm.* **78**, 275-290.

Šavikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Živković, J., Cujjić, N., Tereščenko, M., Bigović, D. (2013) Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in south-western Serbia, Zlatibor district. *J. Ethnopharmacol.* **146**, 803–810.

- Šeremet, D., Vugrinec, K., Petrović, P., Butorac, A., Kuzmić, S., Cebin, A. V., Mandura, A., Lovrić, M., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chem.* **370**, 131257.
- Šeremet, D., Žižek, K., Žepić, I., Kovačević, M., Nodilo, L. N., Vrsaljko, D., Katančić, Z., Sokač, K., Kuzmić, S., Komes, D. (2024). Effect of guar gum-based carriers on the physical and bioactive properties of spray-dried delivery systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Food Hydrocolloid.* **150**, 109658.
- Takahama, U., Hirota, S. (2013) Effects of starch on nitrous acid-induced oxidation of kaempferol and inhibition of α -amylase-catalysed digestion of starch by kaempferol under conditions simulating the stomach and the intestine. *Food Chem.* **141**, 313–319.
- Tan, L.H., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2005) Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *J. Microencapsul.* **22**, 253–259.
- Tang, C.H., Ten, Z., Wang, X.S., Yang, X.Q. (2006) Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 8945–8950.
- Tanino, T., Nagai, N., Funakami, Y. (2015) Phloridzin-sensitive transport of echinacoside and acteoside and altered intestinal absorption route after application of *Cistanche tubulosa* extract. *J. Pharm. Pharmacol.* **67**, 1457-1465.
- Tarahi, M., Mohamadzade Fakh-davood, M., Ghaedrahmati, S., Roshanak, S., Shahidi, F. (2023b) Physicochemical and sensory properties of vegan gummy candies enriched with high-fiber jaban watermelon exocarp powder. *Foods*, **12**, 1478.
- Tarahi, M., Tahmouzi, S., Kianiani, M.R., Ezzati, S., Hedayati, S., Niakousari, M. (2023a) Current innovations in the development of functional gummy candies. *Foods* **13**, 76.
- Taylor, G. I. (1964) Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lon. A Mat.* **280**, 383-397.
- Taylor, G. I. (1969) Electrically driven jets. *Proc. R. Soc. Lon. A. Mat.* **313**, 453-475.
- Tchabo, W., Kaptso, G.K., Ngea, G.L.N., Wang, K., Bao, G., Ma, Y., Wang, X. Mbofung, C.M. (2022) *In vitro* assessment of the effect of microencapsulation techniques on the stability, bioaccessibility and bioavailability of mulberry leaf bioactive compounds. *Food Biosci.* **47**, 101461.
- Teja, S.B., Patil, S.P., Shete, G., Patel, S., Bansal, A.K. (2013) Drug-excipient behavior in polymeric amorphous solid dispersions. *J. Excip. Food Chem.* **4**, 70-94.
- Teo, W. E. Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* **17**, R89.
- Theron, S.A., Yarin, A.L., Zussman, E., Kroll, E. (2005) Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer* **46** 2889-2899.
- Thumann, T.A., Pferschy-Wenzig, E.-M., Aziz-Kalbhenn, H., Ammar, R.M., Rabini, S., Moissl-Eichinger, C., Bauer, R. (2020) Application of an *in vitro* digestion model to study the metabolic profile changes of an herbal extract combination by UHPLC-HRMS. *Phytomedicine* **71**, 153221.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal.*

Biochem. **27**, 502-520.

Tomescu, A., Rus, C., Pop, G., Alexa, E., Radulov, I., Imbrea, I.M., Negrea, M. (2015) Researches regarding proximate and selected elements composition of some medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Lucrări Științifice USAMV-Iași Seria Agronomie* **58**, 175-180.

Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal Food Eng.* **88**, 411-418.

Trampetti, F., Pereira, C., Rodrigues, M.J., Celaj, O., D'Abrosca, B., Zengin, G., Mollica, A., Stefanucci, A., Custódio, L. (2019) Exploring the halophyte *Cistanche phelypaea* (L.) Cout as a source of health promoting products: *In vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties, metabolomic profile and computational studies. *J. Pharmaceut. Biomed.* **165**, 119-128.

Tripathy, S., Srivastav, P.P. (2023) Encapsulation of *Centella asiatica* leaf extract in liposome: Study on structural stability, degradation kinetics and fate of bioactive compounds during storage. *Food Chemistry Advances* **2**, 100202.

Trovatti, E., Fernandes, S.C., Rubatat, L., da Silva Perez, D., Freire, C.S., Silvestre, A.J., Neto, C.P. (2012) Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Compos. Sci. Technol.* **72**, 1556-1561.

Tsirigotis-Maniecka, M. (2020) Alginate-, carboxymethyl cellulose-, and κ -carrageenan-based microparticles as storage vehicles for cranberry extract. *Molecules* **25**(17) 3998.

Tu, Y. (2011) The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **17**, 1217–1220.

Tumbas, V., Mandić, A., Četković, G., Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J. (2004) HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum* L.) extracts. *Acta Period. Technol.* **35**, 265–273.

Tureyen, A., Navruz, F.Z., Gunay, S., Erden, Y., Ince, S. (2023) Tubuloside A induces DNA damage and apoptosis in human ovarian cancer A2780 Cells. *Eur. J. Ther.* **29**, 900-906.

Turgeon, S.L., Beaulieu, M., Schmitt, C., Sanchez, C. (2003) Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Curr. Opin. Colloid In.* **8**, 401-414.

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1972) *Flora Europaea III*. Cambridge University Press, Cambridge.

Tyagi, V., Kaushik, S., Tyagi, S., Akiyama, T. (2011) Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**, 1373-1391.

Uddin, M. J., Çiçek, S.S., Willer, J., Shulha, O., Abdalla, M.A., Sönnichsen, F., Girreser, U., Zidorn, C. (2020) Phenylpropanoid and flavonoid glycosides from the leaves of *Clerodendrum infortunatum* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **92**, 104131.

Valencia-Avilés, E., Martínez-Flores, H.E., García-Pérez, M., Meléndez-Herrera, E., García-Pérez, M.E. (2019) Investigation of the antibacterial activity and subacute toxicity of a *Quercus crassifolia* polyphenolic bark extract for its potential use in functional foods. *J. Food Sci.* **84**, 1692-1702.

- van de Velde, F. (2008) Structure and function of hybrid carrageenan. *Food Hydrocolloid*. **22**, 727–734.
- Van Eerdenbrugh, B., Taylor, L.S. (2011) An ab initio polymer selection methodology to prevent crystallization in amorphous solid dispersions by application of crystal engineering principles. *CrystEngComm* **13**, 6171-6178.
- Van Wyk, B.E., De Wet, H., van Heerden, F.R. (2008) An ethnobotanical survey of medicinal plants in the southeastern Karoo, South Africa. *S. Afr. J. Bot.* **74**, 696–704.
- Vargas-Muñoz, D.P., da Silva, L.C., de Oliveira, L.A.N., Godoy, H.R., Kurozawa, L.E. (2021) 5-caffeoylquinic acid retention in spray drying of cocona, an Amazonian fruit, using hydrolyzed collagen and maltodextrin as encapsulating agents. *Dry. Technol.* **39**, 1854–1868.
- Vargas-Munoz, D.P., de Oliveira, L.A.N., da Silva, L.C., Godoy, H.T., Kurozawa, L.E. (2020) Storage stability of 5-caffeoylquinic acid in powdered cocona pulp microencapsulated with hydrolyzed collagen and maltodextrin blend. *Food Res. Int.* **137**, 109652.
- Vehring, R. (2008) Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm. Res.* **25**, 999-1022.
- Vehring, R., Foss, W.R., Lechuga-Ballesteros, D. (2007) Particle formation in spray drying. *J Aerosol Sci.* **38**, 728-746.
- Vertuani, S., Beghelli, E., Scalambra, E., Malisardi, G., Copetti, S., Dal Toso, R., Baldissarotto, A., Manfredini, S. (2011) Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules* **16**, 7068-7080.
- Vihnanek Lazarus, M., Sekovanić, A., Kljaković-gašpić, A., Orct, T., Jurasović, J., Kusak, J., Reljić, S., Huber, Đ. (2013) Cadmium and lead in grey wolf liver samples: optimisation of a microwave assisted digestion method. *Arh. Hig. Rada Toksiko.* **64**, 395-403.
- Vladić, J., Janković, T., Živković, J., Tomić, M., Zdunić, G., Šavikin, K., Vidović, S. (2020) Comparative study of subcritical water and microwave-assisted extraction techniques impact on the phenolic compounds and 5-hydroxymethylfurfural content in pomegranate peel. *Plant Food Hum. Nutr.* **75**, 553-560.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules* **19**, 767-782.
- Vujanović, M., Zengin, G., Durović, S., Mašković, P., Cvetanović, A., Radojković, M. (2019) Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. *S. Afr. J. Bot.* **120**, 213–218.
- Vukasović, T. (2017) Functional foods in line with young consumers: Challenges in the marketplace in Slovenia. U: *Developing new functional food and nutraceutical products* (Bagchi, D., Nair, S., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 391–405.
- Vuković, N., Milošević, T., Sukdolak, S., Solujić, S. (2007) Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **4**, 17–20.

- Wan, M., Li, Q., Lei, Q., Zhou, D., Wang, S. (2022) Polyphenols and polysaccharides from morus alba l. fruit attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome modifying the gut microbiota and metabolite profile. *Foods* **11**, 1818.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S.A. (2010) Materials for encapsulation. U: *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (Zuidam, N.J., Nedović, V., ured.), Springer, New York, str. 31-100.
- Wang, G.N., Pan, R.L., Liao, Y.H., Chen, Y., Tang, J.T., Chang, Q. (2010) An LC-MS/MS method for determination of forsythiaside in rat plasma and application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* **878**, 102-106.
- Wang, J., Xue, X., Zhao, X., Luo, L., Liu, J., Dai, S., Zhang, F., Wu, R., Liu, Y., Peng, C., Li, Y. (2023) Forsythiaside A alleviates acute lung injury by inhibiting inflammation and epithelial barrier damages in lung and colon through PPAR- γ /RXR- α complex. *J. Adv. Res.* **60**, 183-200.
- Wang, Q. L., Jin, Y., Xiong, Y. L. (2018). Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. *J. Agr. Food Chem.* **6**, 10827–10834.
- Wang, Q., Xiong, Y.L. (2019) Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **18**, 936-952.
- Wang, X., Li, X., Xue, J., Zhang, H., Wang, F., Liu, J. (2022) Mechanistic understanding of the effect of zein–chlorogenic acid interaction on the properties of electrospun nanofiber films. *Food Chem. X* **16**, 100454.
- Wang, X., Luo, Z., Xiao, Z. (2014) Preparation, characterization, and thermal stability of β -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydr. Polym.* **101**, 1027-1032.
- Wang, X., Zhang, Z. Cao, X. (2024) Salidroside inhibited the proliferation of gastric cancer cells through up-regulating tumor suppressor miR-1343-3p and down-regulating MAP3K6/MMP24 signal molecules. *Cancer Biol. Ther.* **25**, 2322206.
- Wang, X.S., Tang, C.H., Yang, X.Q., Gao, W.R. (2008) Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem.* **107**, 11–18.
- Wang, Y., Guo, Z., Qian, Y., Zhang, Z., Lyu, L., Wang, Y., Ye, F. (2019) Study on the electrospinning of gelatin/pullulan composite nanofibers. *Polymers* **11**, 1424.
- Wang, Y., Padua, G.W. (2012) Nanoscale characterization of zein self-assembly. *Langmuir* **28**, 2429-2435.
- Wang, Y.H., Zhao, M., Barker, S. A., Belton, P.S., Craig, D.Q.M. (2019) A spectroscopic and thermal investigation into the relationship between composition, secondary structure and physical characteristics of electrospun zein nanofibers. *Mater. Sci. Eng. C* **98**, 409-418.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327.
- Wei, X.; Dai, J.; Zhong, Y.; Zhang, D.; Liu, L.; Wang, L.; Huang, Y.; Chen, P.; Zhou, Z.; Chen, X.; Yang, X., Wang, Q. (2021) Caffeic acid phenethyl ester loaded in nano-targeted

delivery system with casein: Physicochemical characterization, *in vitro* release, and binding mechanisms. *LWT-Food Sci. Technol.* **150**, 111938.

Wen, X., Luo, K., Xiao, S., Ai, N., Wang, S., Fan, X. (2016) Qualitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicine analogous formula cheng-Qi decoctions by liquid chromatography–mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 301–311.

Wen, Y., Huo, S., Zhang, W., Xing, H., Qi, L., Zhao, D., Li, N., Xu, J., Yan, M., Chen, X. (2016) Pharmacokinetics, biodistribution, excretion and plasma protein binding studies of acteoside in rats. *Drug Res.* **66**, 148-153.

WHO (2004) Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2.izd., WHO-World Health Organization, Geneva <<https://iris.who.int/handle/10665/42716>>. Pristupljeno 31. svibnja 2024.

WHO (2019) WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization. WHO-World Health Organization, Geneva, <<https://iris.who.int/handle/10665/312342>>. Pristupljeno 1. svibnja 2024.

WHO (2022) WHO establishes the Global Centre for Traditional Medicine in India. WHO-World Health Organization, Geneva, <<https://www.who.int/news/item/25-03-2022-who-establishes-the-global-centre-for-traditional-medicine-in-india>>. Pristupljeno 1. svibnja 2024.

WHO i FAO (2020) Chapter 4: Hazard identification and characterization: toxicological and human studies. section 4.5 Genotoxicity. Environmental health criteria 240: Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. WHO-World Health Organization i FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva.

WHO TEAM (2023) WHO Traditional Medicine Global Summit 2023 meeting report: Gujarat Declaration. WHO TEAM-WHO Global Centre for Traditional Medicine, Geneva, <<https://www.who.int/publications/m/item/who-traditional-medicine-summit-2023-meeting-report--gujarat-declaration>>. Pristupljeno 1. svibnja 2024.

Williams, G. R., Raimi-Abraham, B. T., Luo, C. J. (2018a) Electrospinning fundamentals. U: *Nanofibres in Drug Delivery* (Williams, G.R., Raimi-Abraham, B.T., Luo, C.J., ured.) UCL Press, London, str. 24-59.

Williams, G.R., Raimi-Abraham, B.T., Luo, C.J. (2018b) Monoaxial electrospinning. U: *Nanofibres in drug delivery* (Williams, G.R., Raimi-Abraham, B.T., Luo, C.J., ured.), UCL Press, London, str. 60-96.

Williams, P.A., Phillips, G.O. (2009) Gum arabic. U: *Handbook of Hydrocolloids* (Phillips, G.O., Williams, P.A., ured.), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Sawston, str. 252–273.

Wong, I.Y.F., He, Z.D., Huang, Y., Chen, Z.Y. (2001) Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3113-3119.

Woo, M., Daud, W., Mujumdar, A., Tasirin, S., Talib, M. (2010) Role of rheological characteristics in amorphous food particle-wall collisions in spray drying. *Powder Technol.* **198**, 251–257.

Wu, G., Meininger, C.J. (2002) Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 61–86.

- Wu, L., Georgiev, M.I., Cao, H., Nahar, L., El-Seedi, H.R., Sarker, S.D., Xiao, J., Lu, B. (2020) Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med. Res. Rev.* **40**, 2605-2649.
- Wu, L., Huang, W., Peng, K., Wang, Y., Chen, Q., Lu, B. (2023) Enhancing the stability, BBB permeability and neuroprotective activity of verbascoside *in vitro* using lipid nanocapsules in combination with menthol. *Food Chem.* **414**, 135682.
- Wu, L., Huang, W., Peng, K., Wang, Y., Chen, Q., Lu, B. (2023) Enhancing the stability, BBB permeability and neuroprotective activity of verbascoside *in vitro* using lipid nanocapsules in combination with menthol. *Food Chem.* **414**, 135682.
- Wyatt, N.B., Gunther, C.M., Liberatore, M.W. (2011) Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt. *Polymer* **52**, 2437–2444.
- Wypij, M., Rai, M., Zemljič, L.F., Bračić, M., Hribernik, S., Golińska, P. (2023) Pullulan-based films impregnated with silver nanoparticles from the *Fusarium culmorum* strain JTW1 for potential applications in the food industry and medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, 1241739.
- Xia, W., Ma, L.; Chen, X.; Li, X.; Zhang, Y. (2018) Physicochemical and structural properties of composite gels prepared with myofibrillar protein and lecithin at various ionic strengths. *Food Hydrocolloid.* **82**, 135–143.
- Xie, J.H., Tang, W., Jin, M.L., Li, J.E., Xie, M.Y. (2016) Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities. *Food Hydrocolloid.* **60**, 148-160.
- Xing, S., Peng, Y., Wang, M., Chen, D., Li, X. (2014) *In vitro* human fecal microbial metabolism of forsythoside A and biological activities of its metabolites. *Fitoterapia* **99**, 159-165.
- Xiong, L., Mao, S., Lu, B., Yang, J., Zhou, F., Hu, Y., Jiang, Y., Shen, C., Zhao, Y. (2016) *Osmanthus fragrans* flower extract and acteoside protect against d-galactose-induced aging in an ICR mouse model. *J. Med. Food* **19**, 54-61.
- Xu, C. Y., Xu, C., Xu, Y.N., Du, S.Q., Dai, Z.H., Jin, S.Q., Zheng, G., Xie, C.L., Fang, W.L. (2024) Poliumoside protects against type 2 diabetes-related osteoporosis by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 pathway. *Phytomedicine* **125**, 155342.
- Xu, L., Shi, W., Cai, C.-B., Zhong, W., Tu, K. (2015) Rapid and nondestructive detection of multiple adulterants in kudzu starch by near infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics. *LWT-Food Sci. Technol.* **61**, 920 590-595.
- Xue, Z., Yang, B. (2016) Phenylethanoid glycosides: research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules* **21**, 991.
- Yahya, N.A., Attan, N., Wahab, R.A. (2018) An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food Bioprod. Process.* **112**, 69–85.
- Yan, Y., Liu, T.X., Bi, D, Liu, W.J., Song, Q.Q., Li, J., Song, Y.L., Tu, P.F., Zhao, Y.F. (2018) Transformation pathways in methanol of echinacoside, a principal effective ingredient of *Cistanches herba*. *China J. Chin. Mater. Med.* **43**, 2321-2325.

- Yang, L., Cao, X., Gai, A., Qiao, X., Wei, Z., Li, J., Xu, J., Xue, C. (2022) Chitosan/guar gum nanoparticles to stabilize Pickering emulsion for astaxanthin encapsulation. *LWT-Food Sci. Technol.* **165**, 113727.
- Yang, L., He, J. (2020) Lagopsis supina extract and its fractions exert prophylactic effects against blood stasis in rats via anti-coagulation, anti-platelet activation and anti-fibrinolysis and chemical characterization by LC-qTOF-MS/MS. *Biomed. Pharmacother.* **132**, 110899.
- Yang, R., Zha, X., Gao, X., Wang, K., Cheng, B., Yan, B. (2022) Multi-stage virtual screening of natural products against p38 α mitogen-activated protein kinase: predictive modeling by machine learning, docking study and molecular dynamics simulation. *Heliyon* **8** 10495.
- Yang, X.M., Yang, Y., Wang, D.Y., Dao-Cheng, W.U., Zhang, A.L. (2016) The study of immune activities of extracts from wild and cultivated *Cistanche deserticola* in Xinjiang. *Biotechnol. Bull.* **32**, 131.
- Yang, Y., Shi, Y., Cao, X., Liu, Q., Wang, H., Kong, B. (2021) Preparation and functional properties of poly (vinyl alcohol)/ethyl cellulose/tea polyphenol electrospun nanofibrous films for active packaging material. *Food Control* **130**, 108331.
- Yang, Z.Y., Lu, D.Y., Yao, S., Zhang, R.R., Jiang, Z.J., Ma, Z.G. (2013) Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Cistanche deserticola* by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Food Drug Anal.* **21**, 50–57.
- Yarin, A.L., Zussman, E. (2004). Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. *Polymer* **45**, 2977-2980.
- Ye, Y., Song, Y., Zhuang, J., Wang, G., Ni, J., Xia, W. (2019) Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells. *J. Cell Physiol.* **234**, 1880-1888.
- Yeong-Geun, L., Kyeong-Hwa, S., Dong-Sung, L., Eun, G.J., Hyoung-Geun, K., Jung-Hwan, K., So-Hyun, P., Young, L.D., Ho, J.I., Nam-In, B. (2018) Phenylethanoid glycoside from *Forsythia koreana* (Oleaceae) flowers shows a neuroprotective effect. *Braz. J. Bot.* **41**, 523–528.
- Yilmaz, M.T., Hassanein, W.S., Alkabaa, A.S., Ceylan, Z. (2022) Electrospun eugenol-loaded gelatin nanofibers as bioactive packaging materials to preserve quality characteristics of beef. *Food Packaging Shelf.* **34**, 100968.
- Yin, G., Zeng, H., He, M., Wang, M. (2009) Extraction of *Teucrium manghuaense* and evaluation of the bioactivity of its extract. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 4330–4341.
- Yin, S.W., Tang, C.H., Wen, Q.B., Yang, X.Q. (2009) Functional and structural properties and *in vitro* digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Int. J. Food Sci. Tech.* **44**, 2653–2661.
- Yoo, S.H., Perera, C., Shen, J., Ye, L., Suh, D.S., Jane, J.L. (2009) Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 1556-1564.
- Yousif, M., Mohamed, B., Elkhedir, A. (2017) Physicochemical characterization of gum of some guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taup) lines. *J. Food Process Technol.* **8**, 2.

- Yu, H.J., Fridrikh, S.V., Rutledge, G.C. (2006) The role of elasticity in the formation of electrospun fibers. *Polymer* **47**, 4789-4797.
- Yu, J.Z., Wang, J., Sheridan, S.D., Perlis, R.H., Rasenick, M.M. (2021) N-3 polyunsaturated fatty acids promote astrocyte differentiation and neurotrophin production independent of cAMP in patient-derived neural stem cells. *Mol. Psychiatr.* **26**, 4605-4615.
- Yu, S., Liu, L., Wen, T., Liu, Y., Wang, D., He, Y., Liang, Y., Liu, X., Xie, L., Wang, G., Wei, W. (2008) Development and validation of a liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric method for the determination of salidroside in rat plasma: application to the pharmacokinetics study. *J. Chromatogr. B* **861**, 10-15.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016) The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* **21**, 1-18.
- Yuan, P., Fu, C., Yang, Y., Adila, A., Zhou, F., Wei, X., Wang, W., Lv, J., Li, Y., Xia, L., Li, J. (2021) *Cistanche tubulosa* phenylethanoid glycosides induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by mitochondria - dependent and MAPK pathways and enhance antitumor effect through combination with cisplatin. *Integr. Cancer Ther.* **20**, 15347354211013085.
- Yuan, Y., Huang, J., He, S., Ma, M., Wang, D., Xu, Y. (2021) One-step self-assembly of curcumin-loaded zein/sophorolipid nanoparticles: physicochemical stability, redispersibility, solubility and bioaccessibility. *Food Funct.* **12**, 5719-5730.
- Yue, Z., Zhou, J., Du, X., Wu, L., Wang, J., Wang, X. (2023) Incorporating charged Ag@MOFs to boost the antibacterial and filtration properties of porous electrospinning polylactide films. *Int. J. Biol. Macromol.* **250**, 126223.
- Yuksel, Z., Avci, E., Erdem, Y.K. (2010) Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem.* **121**, 450-456.
- Zakon o zaštiti životinja (2017) *Narodne novine* **102**, Zagreb.
- Zambak, Ö., Özkal, A., Özkal, S. G. (2022) Production of clove extract loaded pullulan and whey protein nanofibers as antioxidant and antibacterial agent. *J. Appl. Polym. Sci.* **139**, 53141.
- Zarshenas, M.M., Zargaran, A., Muller, J., Mohagheghzadeh, A. (2013) Nasal drug delivery in traditional Persian medicine. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **8**, 144-148.
- Zeghib, W., Boudjouan, F., Bachir-bey, M. (2022) Optimization of phenolic compounds recovery and antioxidant activity evaluation from *Opuntia Ficus indica* using response surface methodology. *J. Food Meas. Charact.* **16**, 1-13.
- Zeinali, T., Alemzadeh, E., Zarban, A., Khorashadizadeh, M., Ansarifard, E. (2021) Fabrication and characterization of jujube extract-loaded electrospun polyvinyl alcohol nanofiber for strawberry preservation. *Food Sci. Nutr.* **9**, 6353-6361.
- Zeng, F., Li, T., Zhao, H., Chen, H., Yu, X., Liu, B. (2019) Effect of debranching and temperature-cycled crystallization on the physicochemical properties of kudzu (*Pueraria lobata*) resistant starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **129**, 1148-1154.
- Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X. (2003) Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *J. Control. Release* **92**, 227-231.

Zeng, Y., Himmel, M.E., Ding, S.Y. (2017) Visualizing chemical functionality in plant cell walls. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1-16.

Zhang, B., Wu, C., Li, H., Hu, X., Jin, Z., Tian, Y., Xu, X. (2015) Long-term annealing of C-type kudzu starch: Effect on crystalline type and other physicochemical properties. *Starch-Stärke*, **67** 577-584.

Zhang, D., Jiang, F., Ling, J., Ouyang, X. K., Wang, Y. G. (2021) Delivery of curcumin using a zein-xanthan gum nanocomplex: Fabrication, characterization, and *in vitro* release properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **204**, 111827.

Zhang, D., Lu, C., Yu, Z., Wang, X., Yan, L., Zhang, J., Li, H., Wang, J., Wen, A. (2017) Echinacoside alleviates UVB irradiation-mediated skin damage via inhibition of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017.

Zhang, D., Zhang, B., Lv, J.T., Sa, R.N., Zhang, X.M., Lin, Z.J. (2020) The clinical benefits of Chinese patent medicines against COVID-19 based on current evidence. *Pharmacol. Res.* **157**, 104882.

Zhang, H., Liu, Z., Fang, H., Chang, S., Ren, G., Cheng, X., Pan, Y., Wu, R., Liu, H., Wu, J. (2023) Construction of probiotic double-layered multinucleated microcapsules based on sulfhydryl-modified carboxymethyl cellulose sodium for increased intestinal adhesion of probiotics and therapy for intestinal inflammation induced by *Escherichia coli* O157: H7. *ACS Appl. Mater. Inter.* **15**, 18569-18589.

Zhang, J., Chen, X., Wang, P, Huo, L. (2008) LC–MS determination and pharmacokinetic study of salidroside in rat plasma after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation *Rhodiola crenulata* extract. *Chromatographia* **67**, 695-700.

Zhang, M., Yang, B., Yuan, Z., Sheng, Q., Jin, C., Qi, J., Yu, M., Liu, Y., Xiong, G. (2023) Preparation and performance testing of corn starch/pullulan/gallic acid multicomponent composite films for active food packaging. *Food Chem. X* **19**, 100782.

Zhang, M.Q., Ren, X., Zhao, Q., Yue, S.J., Fu, X.M., Li, X., Chen, K.X., Guo, Y.W., Shao, C.L., Wang, C.Y. (2020) Hepatoprotective effects of total phenylethanoid glycosides from *Acanthus ilicifolius* L. against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J. Ethnopharmacol.* **256**, 112795.

Zhang, Q., Cheng, Z., Wang, Y., Fu, L. (2021) Dietary protein-phenolic interactions: Characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **61**, 3589-3615.

Zhang, S., Zhu, J.Y., Ju, Y., Lv, M., Yang, R.H., Li, Y., Miao, Y., Wang, Y. (2023) *Drosophila* model and network pharmacology to explore novel targets and novel active components of Chinese traditional medications for treating kidney stones. *Pharmacol. Res.-Mod. Chin. Med.* **6**, 100220.

Zhang, W., Liu, X., Wang, Q., Zhang, H., Li, M., Song, B., Zhao, Z. (2018) Effects of potassium fertilization on potato starch physicochemical properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **117**, 467-472.

Zhang, Y., Zhang, L., Liu, J., Liang, J., Si, J., Wu, S. (2017) *Dendrobium officinale* leaves as a new antioxidant source. *J. Funct. Foods* **37**,400-415.

Zhang, Z., Du, M., Cheng, X., Dou, X., Zhou, J., Wu, J., Xie, X., Zhu, M. (2024) A disposable paper-based electrochemical biosensor decorated by electrospun cellulose acetate nanofibers for highly sensitive bio-detection. *Analyst* **149**, 2436-2444.

Zhao, H., Li, H., Li, X., Gao, X. (2021) Process intensification for improving the uniformity and efficiency of microwave heating reactor by bubbles-enhanced flow method. *Appl. Therm. Eng.* **197**, 117346.

Zhao, L., Tong, Q., Wang, H., Liu, Y., Xu, J., Rehman, A. (2020) Emulsifying properties and structure characteristics of octenyl succinic anhydride-modified pullulans with different degree of substitution. *Carbohydr. Polym.* **250**, 116844.

Zhao, Q., Yu, X., Zhou, C., Yagoub, A.E.A., Ma, H. (2020) Effects of collagen and casein with phenolic compounds interactions on protein *in vitro* digestion and antioxidation. *LWT-Food Sci. Technol.* **124**, 109192.

Zhao, S., Wu, X., Wang, L., Huang, Y. (2004) Electrospinning of ethyl-cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 242-246.

Zhao, Y., Chang, X., Gu, X., Li, Y., Zheng, Y., Fang, H. (2023) Predictive analysis of quality markers of *Atractylodis rhizoma* based on fingerprint and network pharmacology. *J. AOAC Int.* **106**, 1402-1413.

Zhao, Y., Khalid, N., Shu, G., Neves, M.A., Kobayashi, I., Nakajima, M. (2017a) Formulation and characterization of oil-in-water emulsions stabilized by gelatinized kudzu starch. *Int. J. Food Prop.* **20**, 1329-1341.

Zhao, Y., Khalid, N., Shu, G., Neves, M.A., Kobayashi, I., Nakajima, M. (2017b) Formulation and characterization of O/W emulsions stabilized using octenyl succinic anhydride modified kudzu starch. *Carbohydr. Polym.* **176**, 91-98.

Zhao, Y., Wang, M., Sun, L., Jiang, X., Zhao, M., Zhao, C. (2020) Rapid characterization of the chemical constituents of Sanhua decoction by LC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *RSC Adv.* **10**, 26109.

Zhou, B., Utjapimuk, S., Yan, K., Dubey, R., Kikuchi, T., Mitsuhashi, T., Fujita, M. (2024) Rapid analysis of trace amounts of amino acid derivatives by a formyl group-installed crystalline sponge. *Chem.-Asian J.* **19**, 202300969.

Zhou, F., Huang, W., Li, M., Zhong, Y., Wang, M., Lu, B. (2018) Bioaccessibility and absorption mechanism of phenylethanoid glycosides using simulated digestion/Caco-2 intestinal cell models. *J. Agr. Food Chem.* **66**, 4630-4637.

Zhou, F., Zhao, Y., Li, M., Xu, T., Zhang, L., Lu, B., Wu, X., Ge, X. (2017) Degradation of phenylethanoid glycosides in *Osmanthus fragrans* Lour. flowers and its effect on anti-hypoxia activity. *Sci. Rep.* **7**, 10068.

Zhu, X., Chen, J., Hu, Y., Zhang, N., Fu, Y., Chen, X. (2021) Tuning complexation of carboxymethyl cellulose/cationic chitosan to stabilize Pickering emulsion for curcumin encapsulation. *Food Hydrocolloid.* **110**, 106135.

Ziaee, A., Albadarin, A. B., Padrela, L., Faucher, A., O'Reilly, E., Walker, G. (2017) Spray drying ternary amorphous solid dispersions of ibuprofen-An investigation into critical formulation and processing parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **120**, 43-51.

Ziaee, A., Albadarin, A.B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E., Walker, G. (2019) Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur. J. Pharm. Sci.* **127**, 300-318.

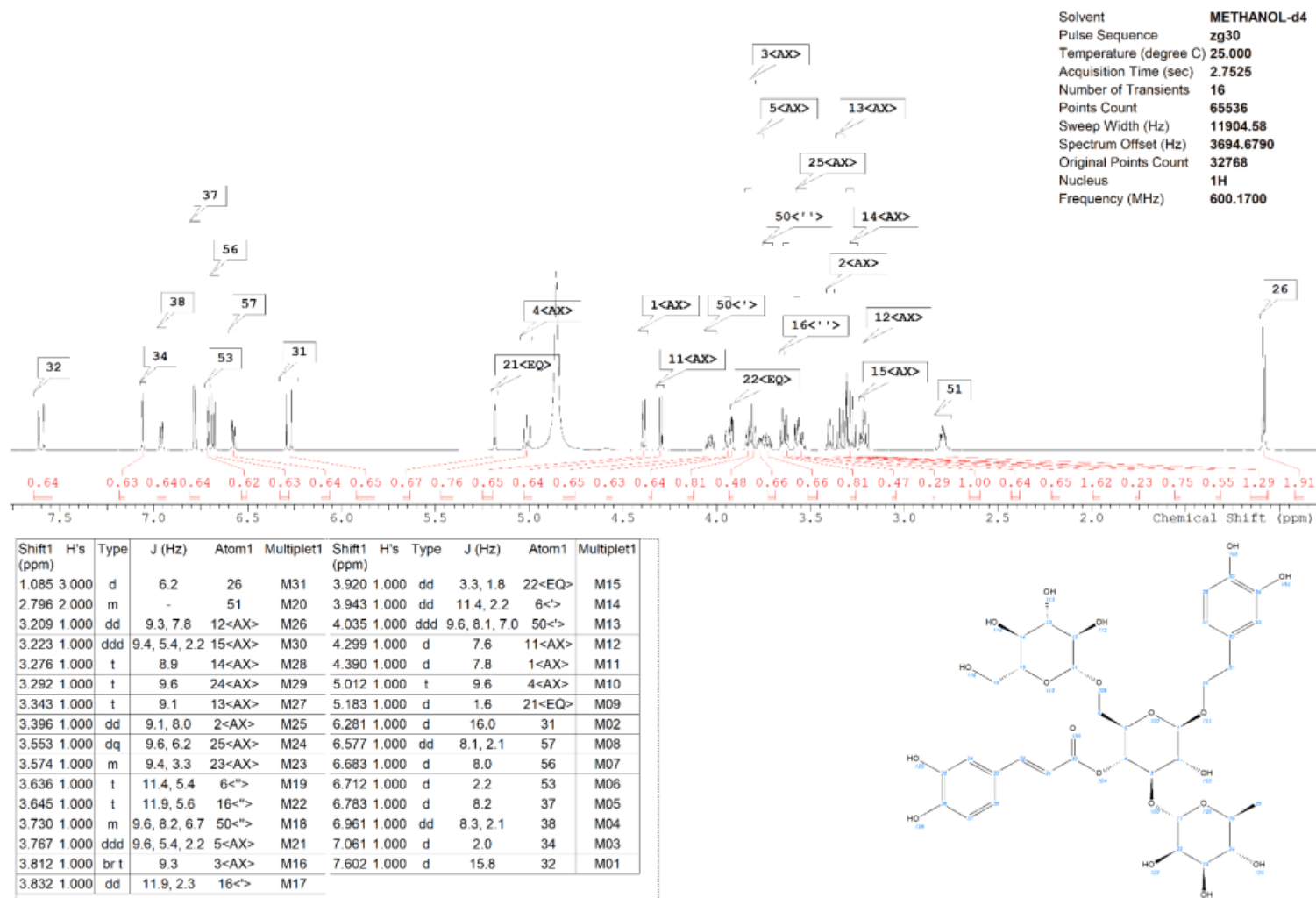
Zlatic, N.M., Stanković, M.S. (2019) Effects of calcareous and serpentinite parent material on the mineral characteristics of soils and plant material of *Teucrium montanum* L. (Lamiaceae). *Environ. monit. assess.* **191**, 564.

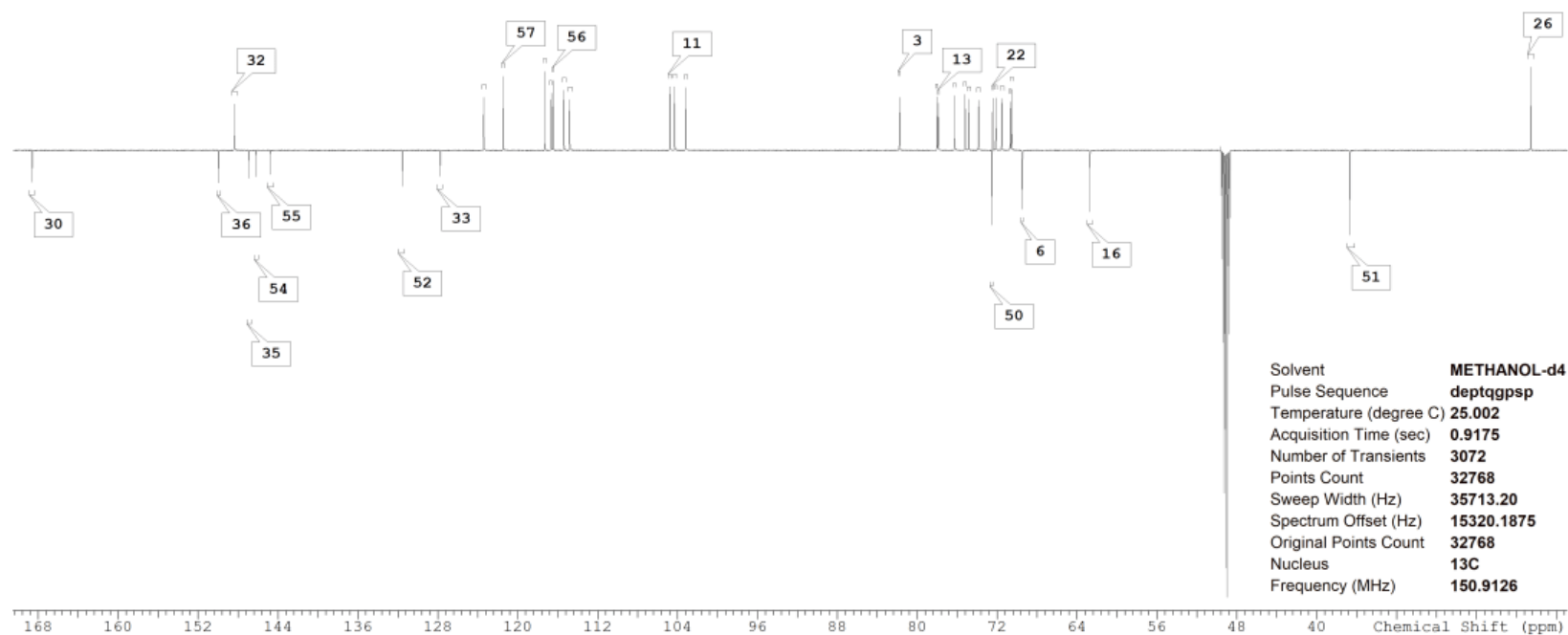
Zlatic, N.M., Stanković, M.S., Simić, Z. (2017) Secondary metabolites and metal content dynamics in *Teucrium montanum* L. and *Teucrium chamaedrys* L. from habitats with serpentine and calcareous substrate. *Environ. Monit. Assess.* **189**, 110.

Zlatković, B. K., Bogosavljević, S. S., Radivojević, A. R., Pavlović, M. A. (2014) Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *J. Ethnopharmacol.* **151**, 704-71.

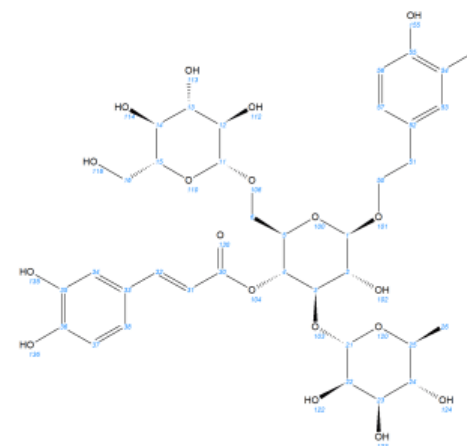
Živanović, M.N., Stojanović, A.Z., Cvetković, D.M., Milutinović, M.G., Stanković, M.S., Marković, S.D. (2016) Effects of *Teucrium* spp.: Extracts on migratory potential and redox status of human colon SW-480 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *Kragujevac J. Sci.* **38**, 161-172.

8. PRILOZI

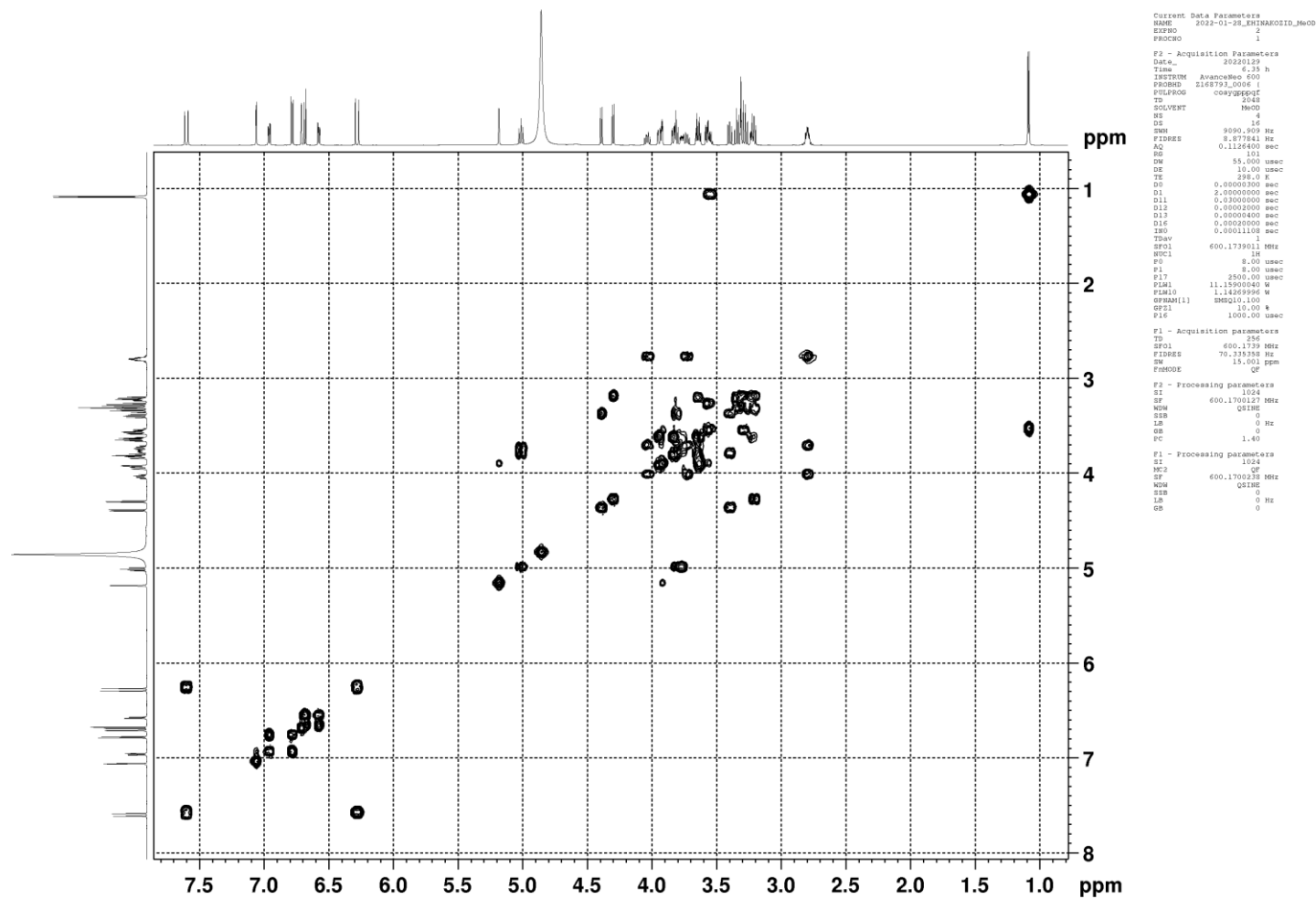
Prilog 1. ¹H NMR spektar ehinakozida u metanolu-d₄ pri 25 °C

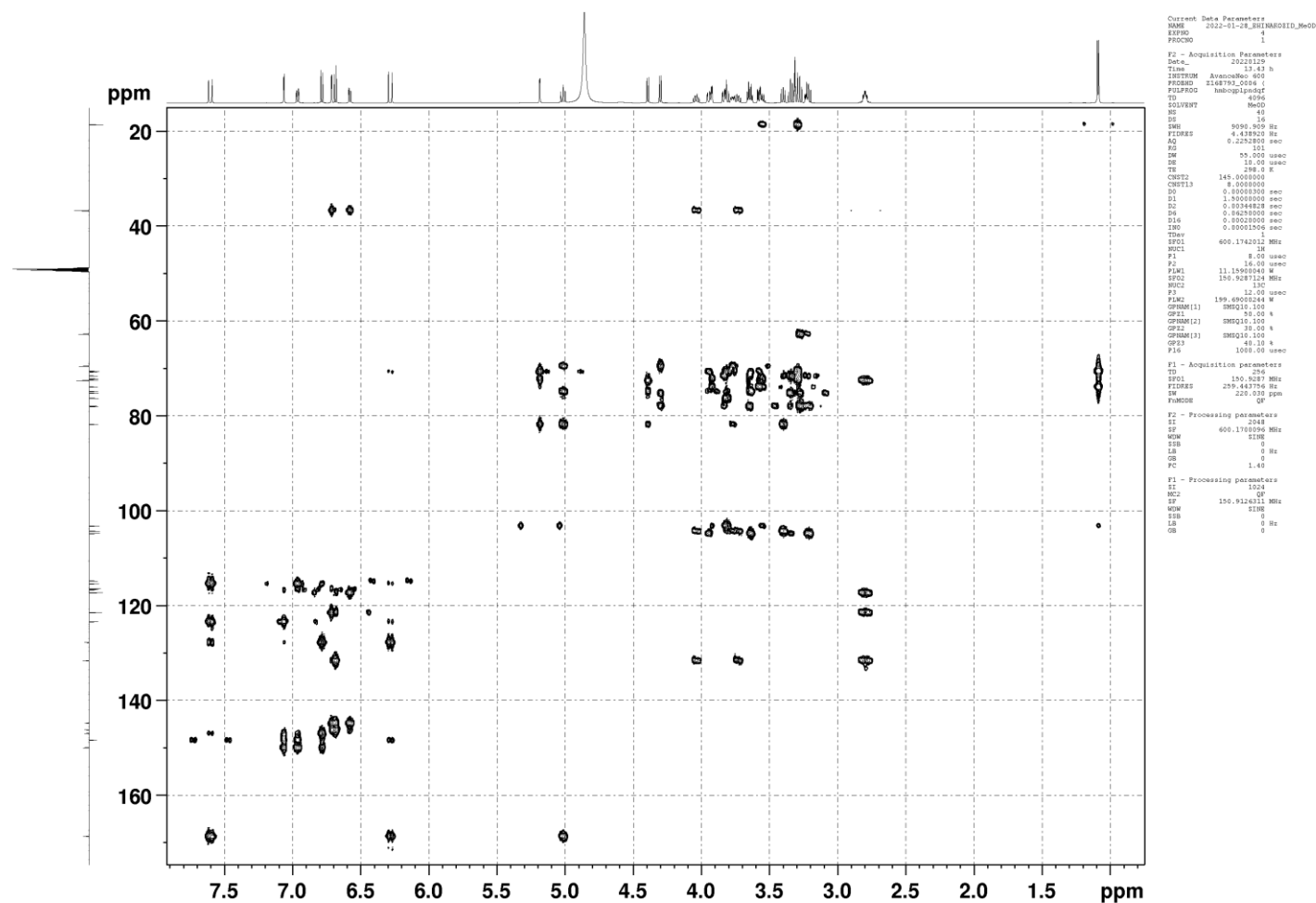


| Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|
| 18.589 | 1.000 | s | 26 | M35 | 78.020 | 1.000 | s | 15 | M20 | 146.218 | 1.000 | s | 54 | M04 |
| 36.680 | 1.000 | s | 51 | M34 | 81.790 | 1.000 | s | 3 | M19 | 146.955 | 1.000 | s | 35 | M03 |
| 62.745 | 1.000 | s | 16 | M33 | 103.196 | 1.000 | s | 21 | M18 | 148.371 | 1.000 | s | 32 | M08 |
| 69.498 | 1.000 | s | 6 | M32 | 104.301 | 1.000 | s | 1 | M17 | 149.967 | 1.000 | s | 36 | M02 |
| 70.574 | 1.000 | s | 25 | M30 | 104.778 | 1.000 | s | 11 | M16 | 168.614 | 1.000 | s | 30 | M01 |
| 70.696 | 1.000 | s | 4 | M29 | 114.809 | 1.000 | s | 31 | M15 | | | | | |
| 71.563 | 1.000 | s | 14 | M28 | 115.387 | 1.000 | s | 34 | M14 | | | | | |
| 72.163 | 1.000 | s | 23 | M27 | 116.478 | 1.000 | s | 56 | M13 | | | | | |
| 72.466 | 1.000 | s | 22 | M26 | 116.651 | 1.000 | s | 37 | M12 | | | | | |
| 72.524 | 1.000 | s | 50 | M31 | 117.279 | 1.000 | s | 53 | M11 | | | | | |
| 73.881 | 1.000 | s | 24 | M25 | 121.454 | 1.000 | s | 57 | M10 | | | | | |
| 74.849 | 1.000 | s | 5 | M24 | 123.411 | 1.000 | s | 38 | M09 | | | | | |
| 75.210 | 1.000 | s | 12 | M23 | 127.759 | 1.000 | s | 33 | M07 | | | | | |
| 76.257 | 1.000 | s | 2 | M22 | 131.579 | 1.000 | s | 52 | M06 | | | | | |
| 77.919 | 1.000 | s | 13 | M21 | 144.788 | 1.000 | s | 55 | M05 | | | | | |

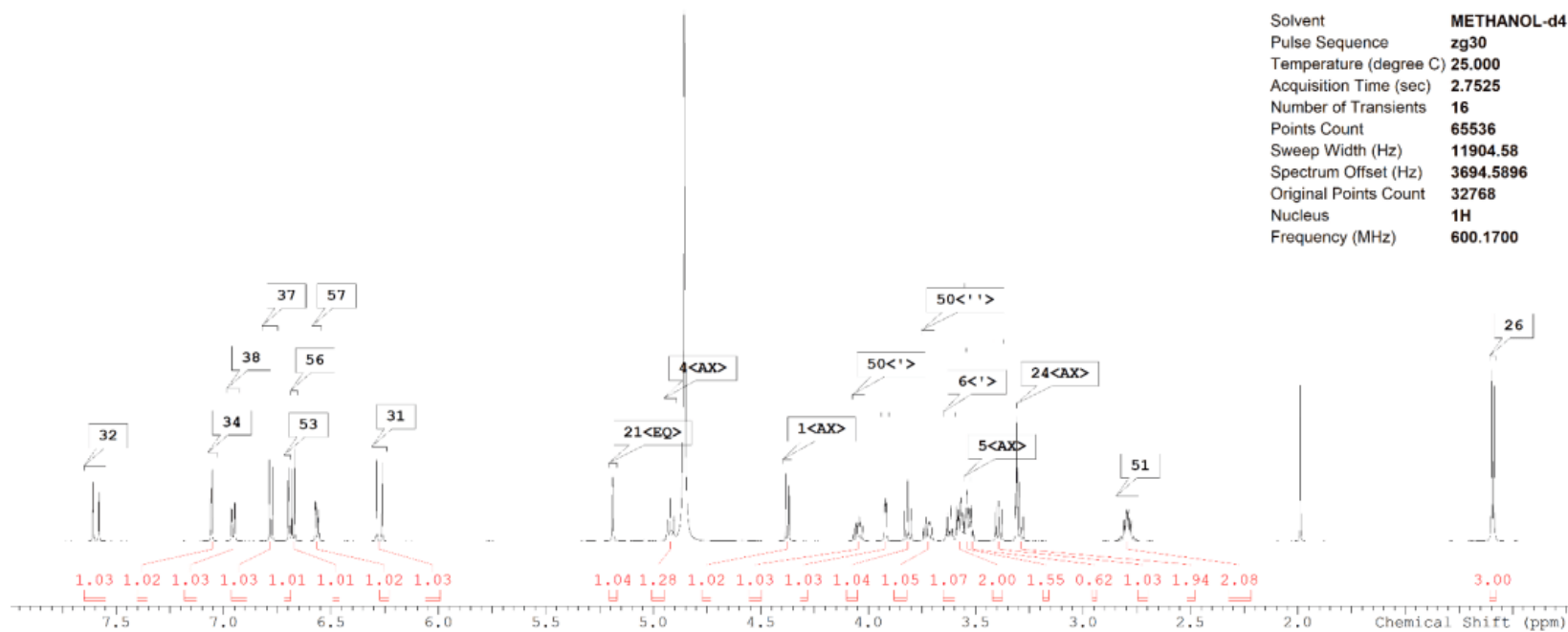


Prilog 2. ^{13}C NRM spektar ehinakozida u metanolu-d₄ pri 25 °C

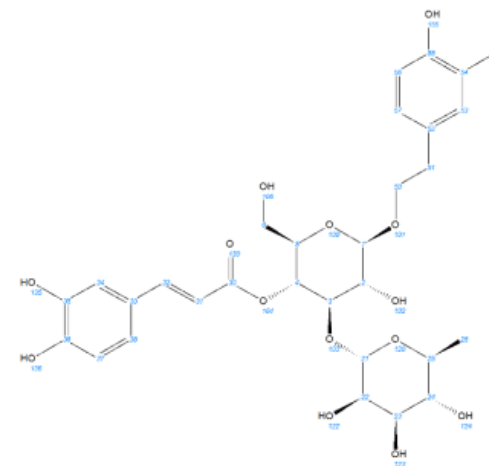
Prilog 3. COSY NMR spektar ehinakozida u metanolu-d₄ pri 25 °C

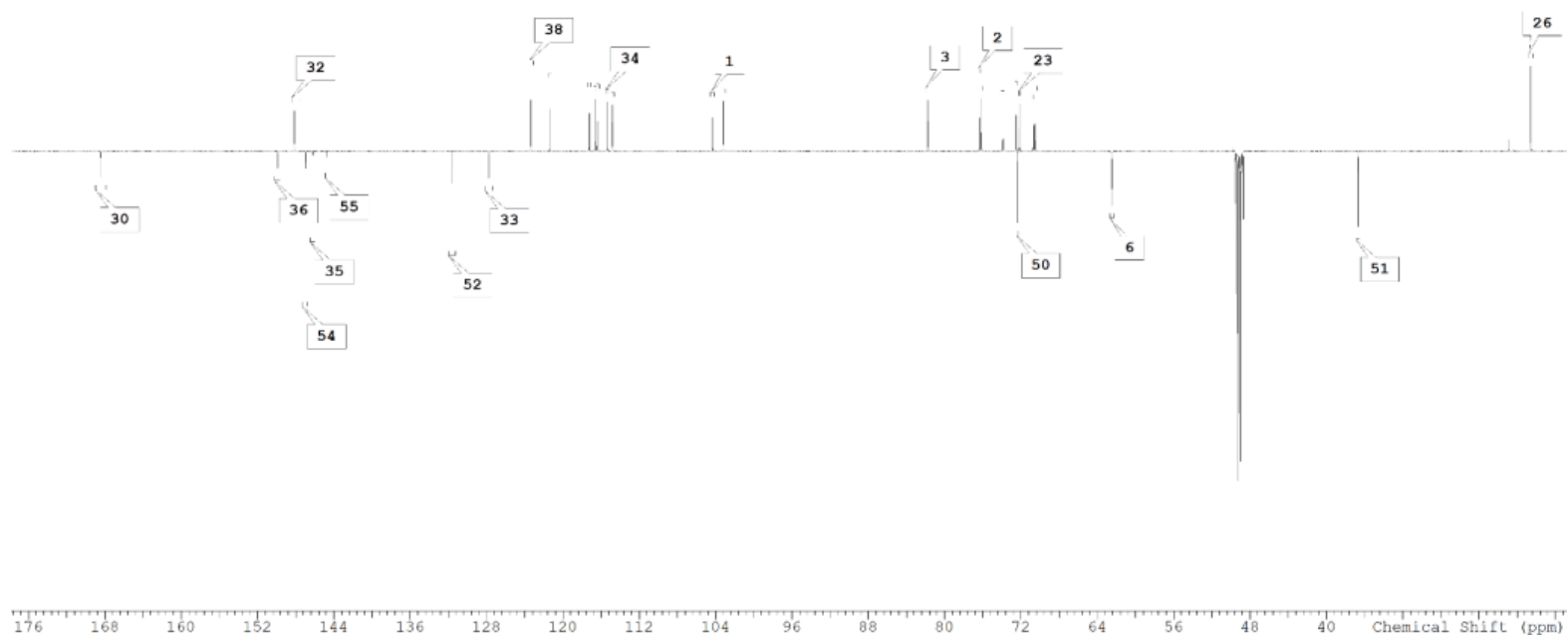


Prilog 5. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar chinakozida u metanolu- d_4 pri 25 °C

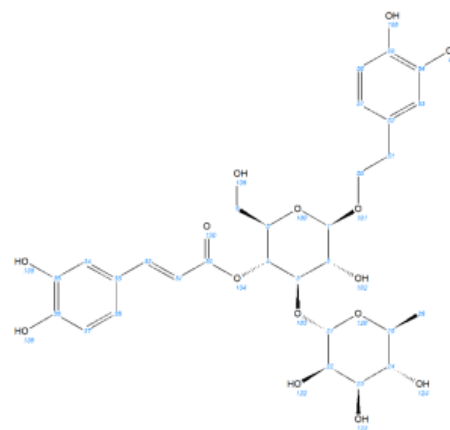


| Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|---------------|----------------|------------|--------------|-------|------|----------|-------|------------|
| 1.094 | 3.000 | d | 6.2 | 26 | M19 | 6.276 | 1.000 | d | 15.8 | 31 | M08 |
| 2.794 | 2.000 | m | - | 51 | M17 | 6.566 | 1.000 | dd | 8.1, 2.1 | 57 | M07 |
| 3.294 | 1.000 | t | 9.6 | 24<AX> | M18 | 6.677 | 1.000 | d | 8.0 | 56 | M06 |
| 3.393 | 1.000 | dd | 9.2, 7.9 | 2<AX> | M20 | 6.698 | 1.000 | d | 2.0 | 53 | M05 |
| 3.524 | 1.000 | dd | 10.2, 5.8 | 6<'> | M21 | 6.780 | 1.000 | d | 8.2 | 37 | M04 |
| 3.542 | 1.000 | m | - | 5<AX> | M22 | 6.956 | 1.000 | dd | 8.2, 2.0 | 38 | M03 |
| 3.572 | 2.000 | m | - | 23<AX>, 25<AX> | M23 | 7.057 | 1.000 | d | 2.0 | 34 | M02 |
| 3.624 | 1.000 | d | 10.0 | 6<'> | M16 | 7.595 | 1.000 | d | 15.8 | 32 | M01 |
| 3.723 | 1.000 | ddd | 9.6, 8.3, 6.8 | 50<'> | M15 | | | | | | |
| 3.816 | 1.000 | t | 9.3 | 3<AX> | M14 | | | | | | |
| 3.920 | 1.000 | dd | 3.2, 1.7 | 22<EQ> | M13 | | | | | | |
| 4.047 | 1.000 | ddd | 9.5, 8.3, 6.7 | 50<'> | M12 | | | | | | |
| 4.376 | 1.000 | d | 7.8 | 1<AX> | M11 | | | | | | |
| 4.921 | 1.000 | br t | 9.4 | 4<AX> | M10 | | | | | | |
| 5.189 | 1.000 | d | 1.6 | 21<EQ> | M09 | | | | | | |

Prilog 7. ^1H NMR spektar verbaskozida u metanolu- d_4 pri 25 °C

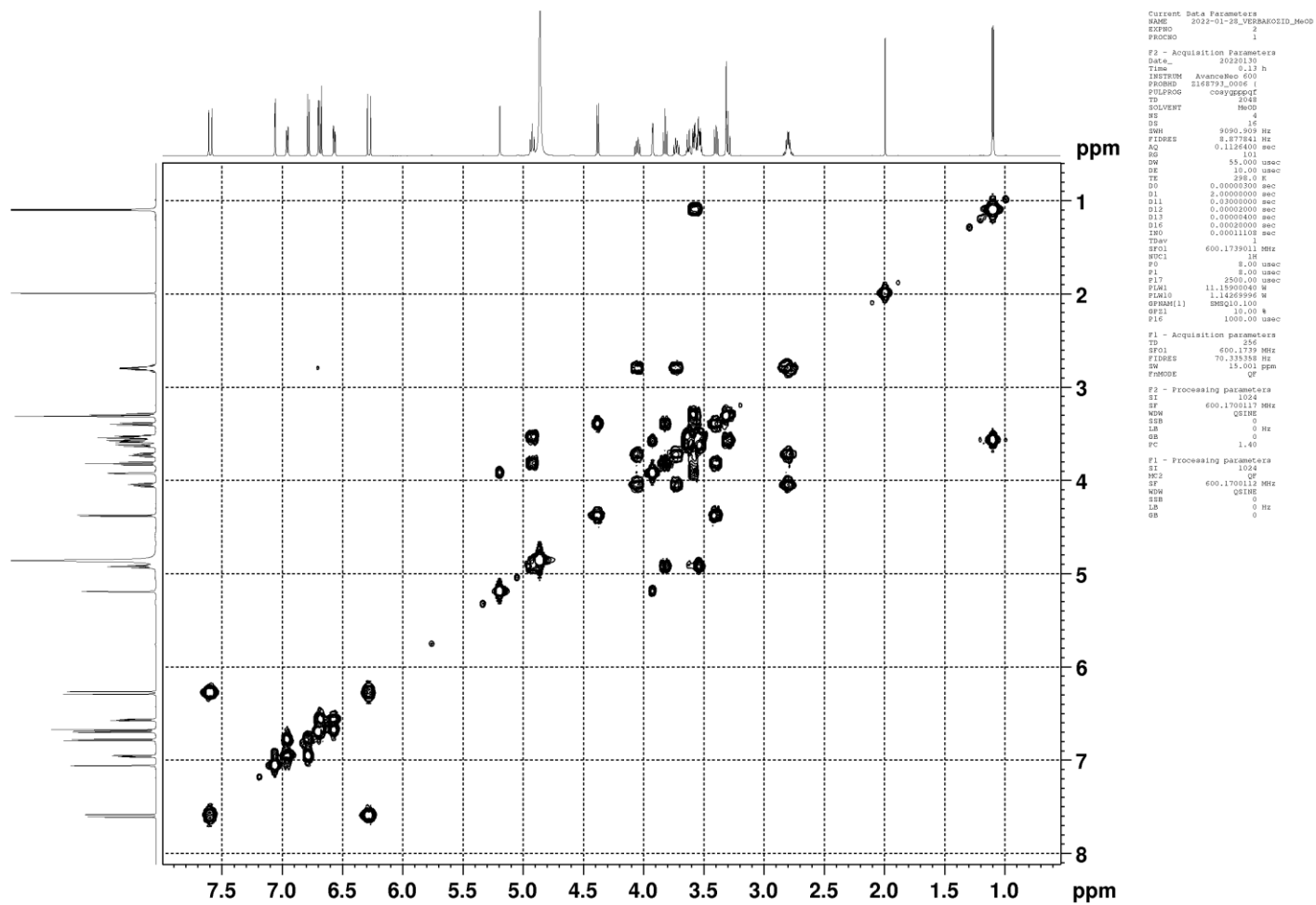


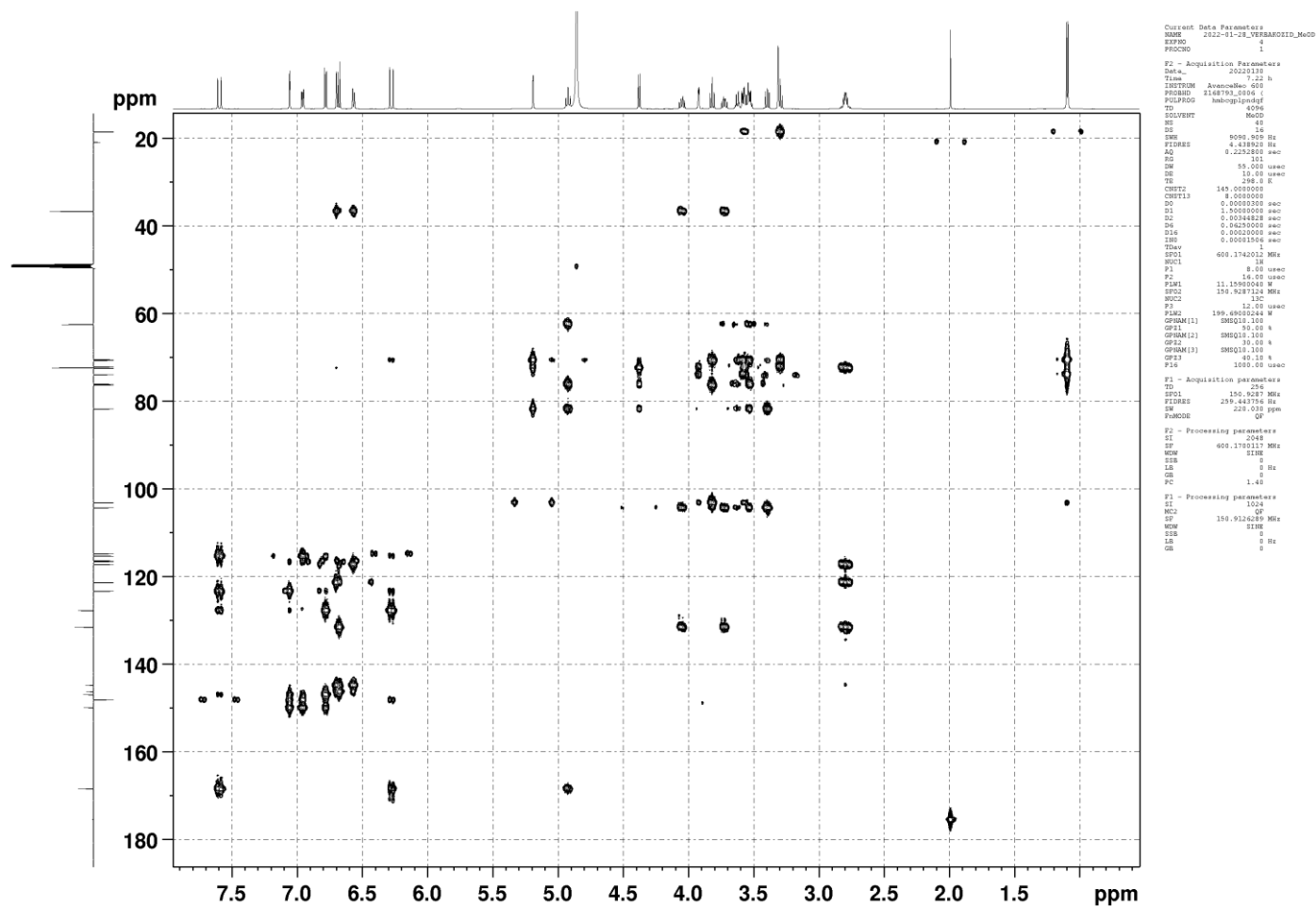
| Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|
| 18.597 | 1.000 | s | 26 | M29 | 115.352 | 1.000 | s | 34 | M14 |
| 36.703 | 1.000 | s | 51 | M28 | 116.436 | 1.000 | s | 56 | M13 |
| 62.493 | 1.000 | s | 6 | M27 | 116.645 | 1.000 | s | 37 | M12 |
| 70.553 | 1.000 | s | 25 | M25 | 117.244 | 1.000 | s | 53 | M11 |
| 70.705 | 1.000 | s | 4 | M24 | 121.397 | 1.000 | s | 57 | M10 |
| 72.178 | 1.000 | s | 23 | M23 | 123.362 | 1.000 | s | 38 | M09 |
| 72.402 | 1.000 | s | 50 | M26 | 127.789 | 1.000 | s | 33 | M08 |
| 72.482 | 1.000 | s | 22 | M22 | 131.595 | 1.000 | s | 52 | M07 |
| 73.919 | 1.000 | s | 24 | M21 | 144.811 | 1.000 | s | 55 | M05 |
| 76.165 | 1.000 | s | 5 | M20 | 146.263 | 1.000 | s | 35 | M04 |
| 76.338 | 1.000 | s | 2 | M19 | 146.964 | 1.000 | s | 54 | M03 |
| 81.784 | 1.000 | s | 3 | M18 | 148.155 | 1.000 | s | 32 | M06 |
| 103.168 | 1.000 | s | 21 | M17 | 149.925 | 1.000 | s | 36 | M02 |
| 104.338 | 1.000 | s | 1 | M16 | 168.428 | 1.000 | s | 30 | M01 |
| 114.832 | 1.000 | s | 31 | M15 | | | | | |



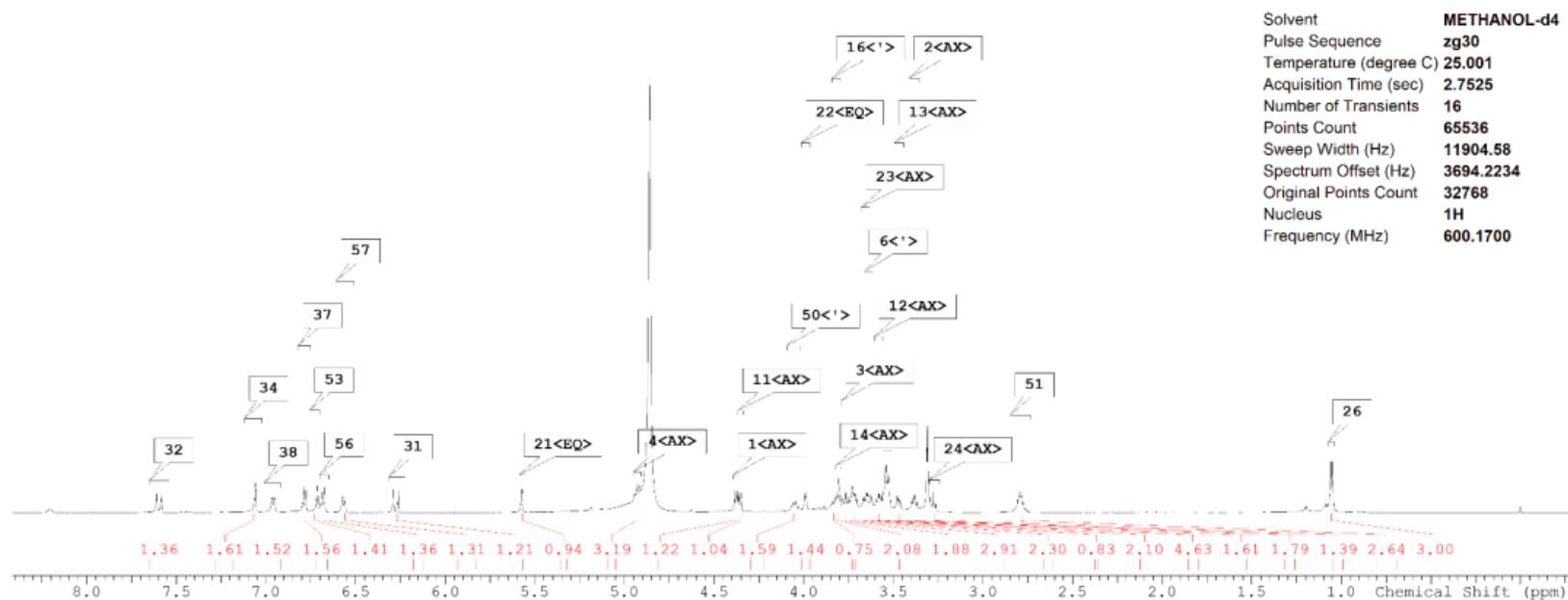
Solvent **METHANOL-d4**
Pulse Sequence **deptqgppsp**
Temperature (degree C) **25.000**
Acquisition Time (sec) **0.9175**
Number of Transients **3072**
Points Count **32768**
Sweep Width (Hz) **35713.20**
Spectrum Offset (Hz) **15322.5537**
Original Points Count **32768**
Nucleus **13C**
Frequency (MHz) **150.9126**

Prilog 8. ^{13}C NMR spektar verbaskozida u metanolu- d_4 pri 25 °C

Prilog 9. COSY NMR spektar verbaskozida u metanolu-d₄ pri 25 °C

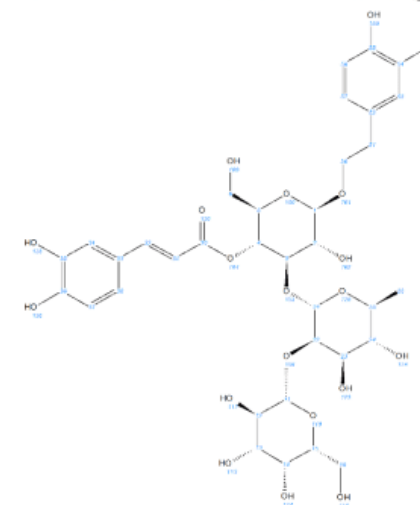


Prilog 11. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar verbaskozida u metanolu- d_4 pri 25 °C

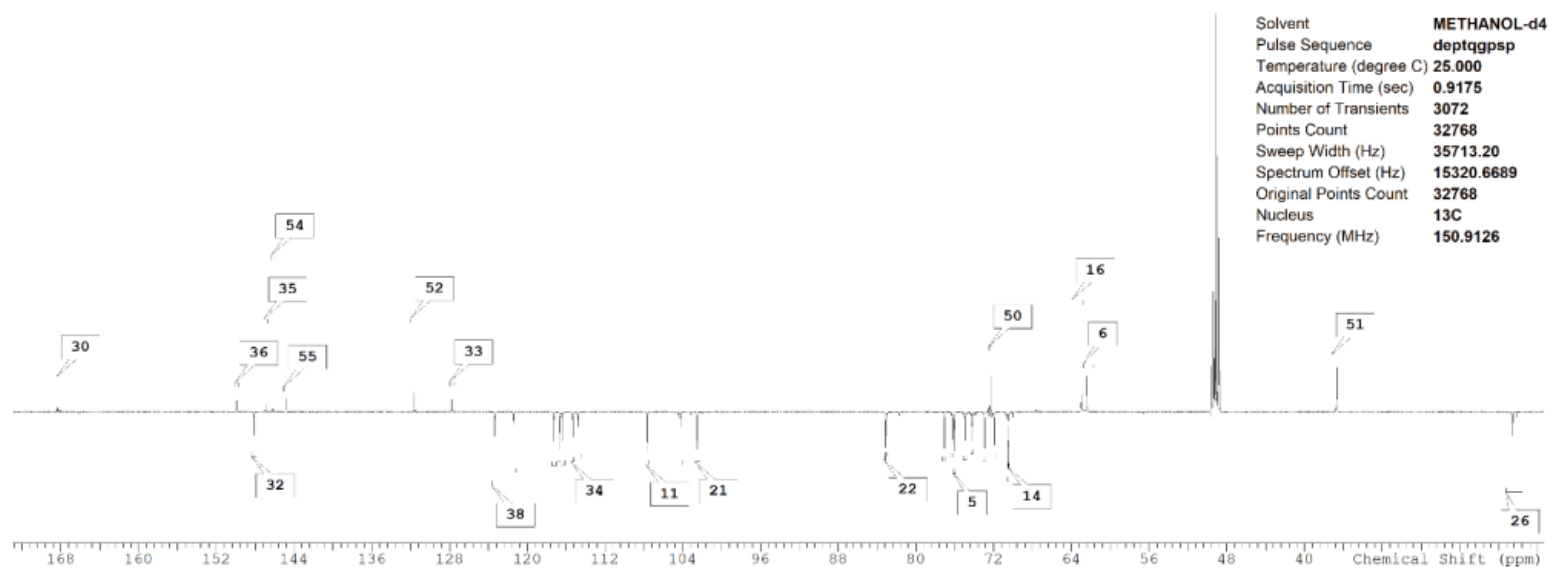


Solvent **METHANOL-d4**
 Pulse Sequence **zg30**
 Temperature (degree C) **25.001**
 Acquisition Time (sec) **2.7525**
 Number of Transients **16**
 Points Count **65536**
 Sweep Width (Hz) **11904.58**
 Spectrum Offset (Hz) **3694.2234**
 Original Points Count **32768**
 Nucleus **1H**
 Frequency (MHz) **600.1700**

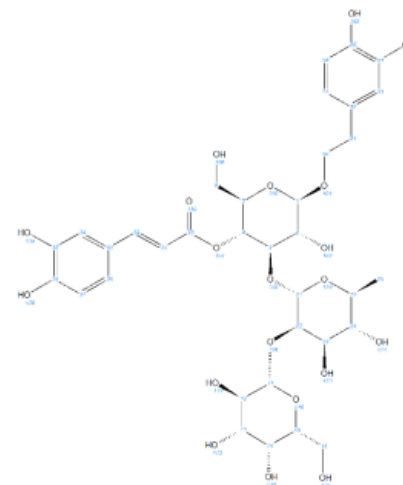
| Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|-------|---------------|-----------------------------|------------|--------------|-------|-------|----------|--------|------------|
| 1.054 | 3.000 | br d | 6.0 | 26 | M15 | 4.355 | 1.000 | br d | 7.6 | 11<AX> | M12 |
| 2.792 | 2.000 | m | - | 51 | M16 | 4.378 | 1.000 | br d | 8.0 | 1<AX> | M11 |
| 3.279 | 1.000 | br t | 9.6 | 24<AX> | M17 | 4.928 | 1.000 | br t | 9.3 | 4<AX> | M10 |
| 3.382 | 1.000 | br t | 9.1 | 2<AX> | M18 | 5.573 | 1.000 | s | - | 21<EQ> | M09 |
| 3.470 | 1.000 | br dd | 9.7, 3.4 | 13<AX> | M19 | 6.276 | 1.000 | br d | 15.8 | 31 | M02 |
| 3.536 | 4.000 | m | - | 5<AX>, 6<'>, 25<AX>, 15<AX> | M21 | 6.567 | 1.000 | dd | 8.0, 1.8 | 57 | M08 |
| 3.582 | 1.000 | br dd | 9.6, 7.8 | 12<AX> | M20 | 6.680 | 1.000 | br d | 8.0 | 56 | M07 |
| 3.635 | 1.000 | br d | - | 6<'> | M22 | 6.714 | 1.000 | br d | 1.8 | 53 | M06 |
| 3.656 | 1.000 | br dd | 9.9, 3.4 | 23<AX> | M23 | 6.784 | 1.000 | br d | 8.2 | 37 | M05 |
| 3.722 | 2.000 | m | - | 50<'>, 16<'> | M25 | 6.959 | 1.000 | br dd | 8.2, 1.8 | 38 | M04 |
| 3.766 | 1.000 | br t | 9.3 | 3<AX> | M24 | 7.059 | 1.000 | br d | 1.8 | 34 | M03 |
| 3.805 | 1.000 | br s | 3.4 | 14<AX> | M27 | 7.598 | 1.000 | br d | 15.8 | 32 | M01 |
| 3.820 | 1.000 | br dd | 11.4, 7.3 | 16<'> | M26 | | | | | | |
| 3.990 | 1.000 | br dd | 3.1, 1.3 | 22<EQ> | M14 | | | | | | |
| 4.052 | 1.000 | m | 9.4, 7.8, 6.7 | 50<'> | M13 | | | | | | |



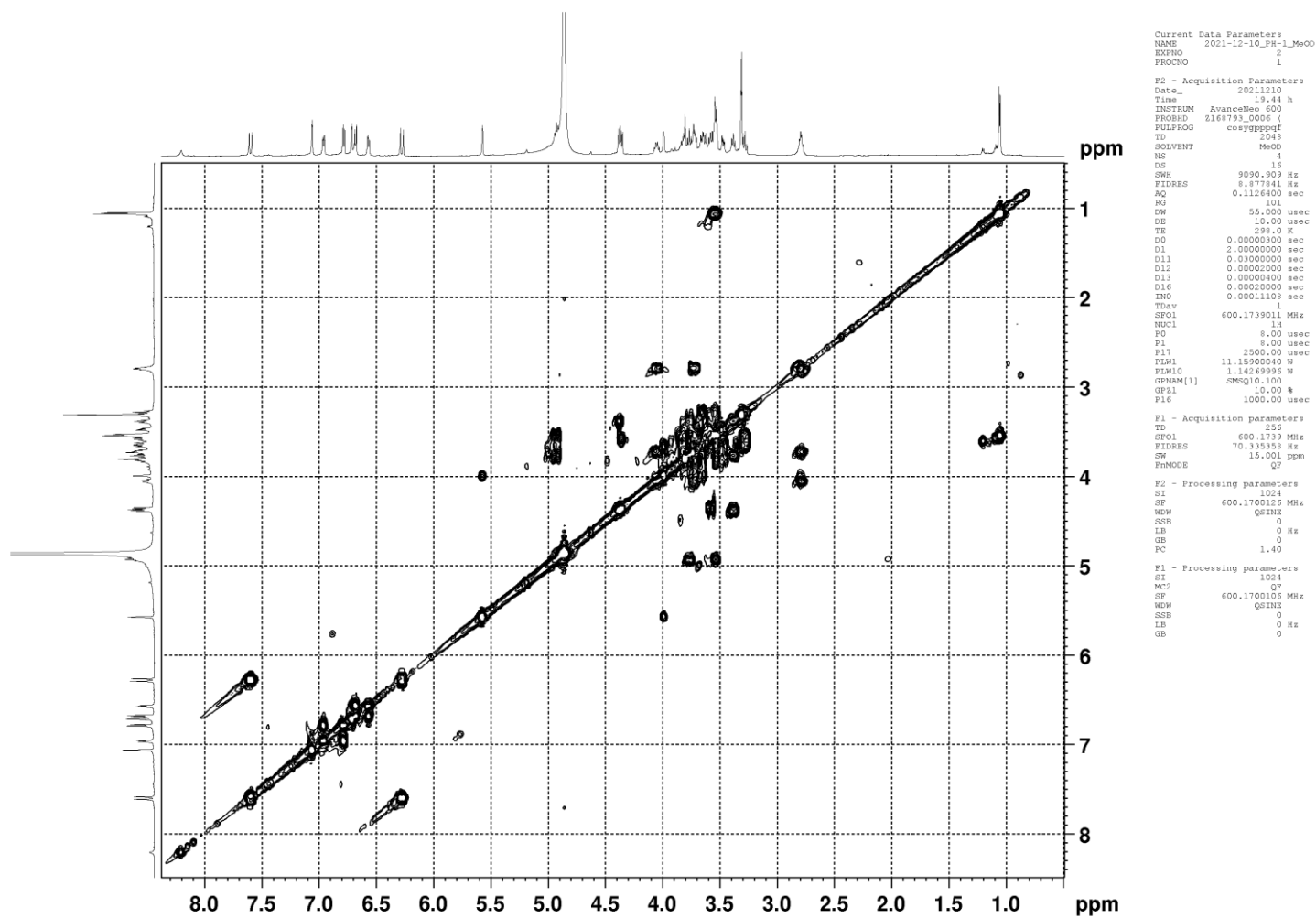
Prilog 12. ^1H NMR spektar polifenolne frakcije **teupolizida** u metanolu- d_4 pri $25\text{ }^\circ\text{C}$



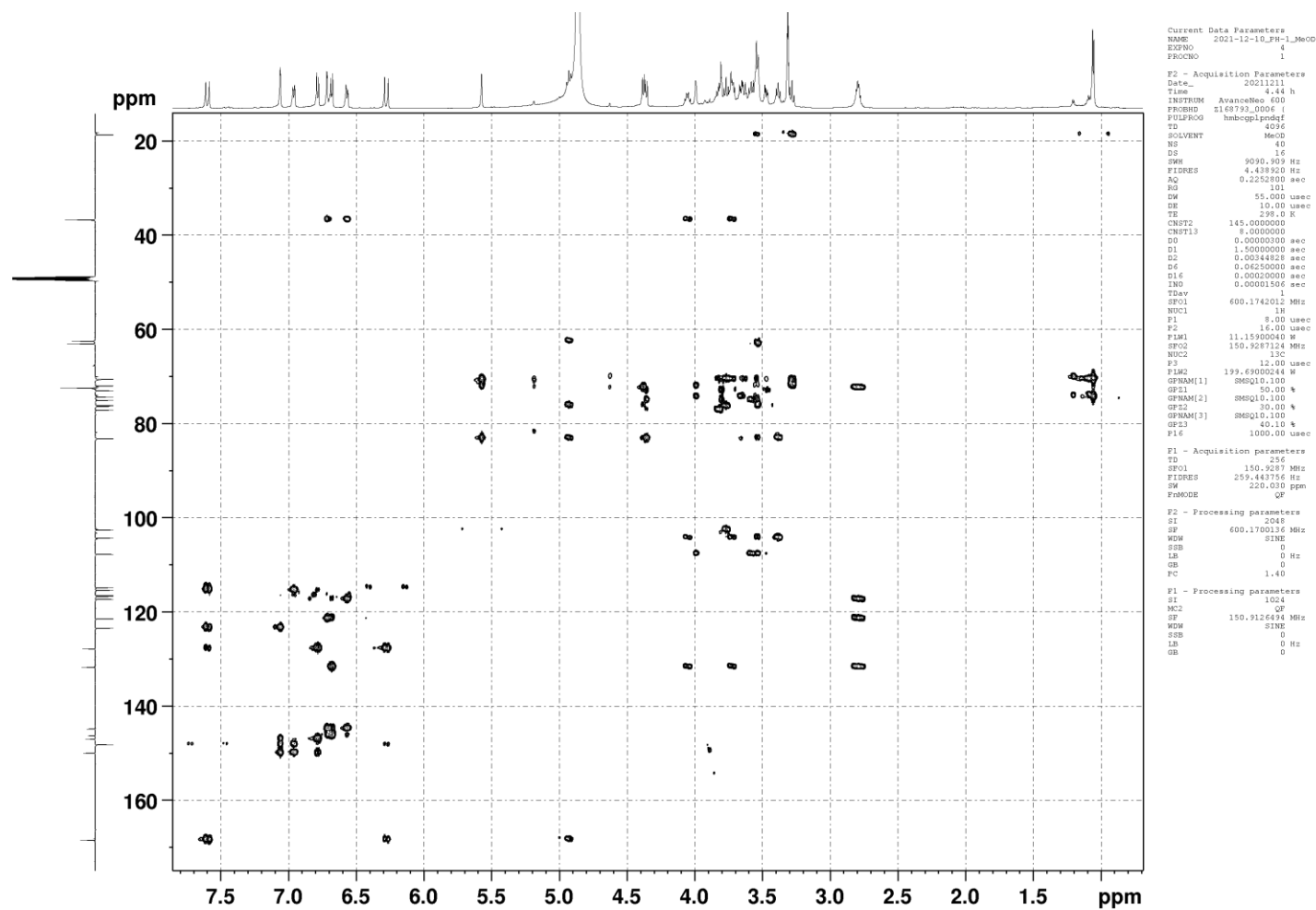
| Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|
| 18.577 | 1.000 | s | 26 | M31 | 83.151 | 1.000 | s | 22 | M19 | 146.965 | 1.000 | s | 35 | M03 |
| 36.640 | 1.000 | s | 51 | M32 | 102.528 | 1.000 | s | 21 | M18 | 148.143 | 1.000 | s | 32 | M08 |
| 62.445 | 1.000 | s | 6 | M33 | 104.239 | 1.000 | s | 1 | M17 | 149.927 | 1.000 | s | 36 | M02 |
| 62.979 | 1.000 | s | 16 | M34 | 107.691 | 1.000 | s | 11 | M16 | 168.379 | 1.000 | s | 30 | M01 |
| 70.497 | 1.000 | s | 14 | M29 | 114.784 | 1.000 | s | 31 | M15 | | | | | |
| 70.548 | 2.000 | s | 4, 25 | M30 | 115.332 | 1.000 | s | 34 | M14 | | | | | |
| 71.942 | 1.000 | s | 23 | M27 | 116.445 | 1.000 | s | 56 | M13 | | | | | |
| 72.346 | 1.000 | s | 50 | M28 | 116.661 | 1.000 | s | 37 | M12 | | | | | |
| 72.953 | 1.000 | s | 12 | M26 | 117.290 | 1.000 | s | 53 | M11 | | | | | |
| 74.246 | 1.000 | s | 24 | M25 | 121.428 | 1.000 | s | 57 | M10 | | | | | |
| 74.990 | 1.000 | s | 13 | M24 | 123.363 | 1.000 | s | 38 | M09 | | | | | |
| 76.073 | 1.000 | s | 5 | M23 | 127.776 | 1.000 | s | 33 | M07 | | | | | |
| 76.261 | 1.000 | s | 2 | M22 | 131.698 | 1.000 | s | 52 | M06 | | | | | |
| 77.070 | 1.000 | s | 15 | M21 | 144.777 | 1.000 | s | 55 | M05 | | | | | |
| 83.093 | 1.000 | s | 3 | M20 | 146.222 | 1.000 | s | 54 | M04 | | | | | |



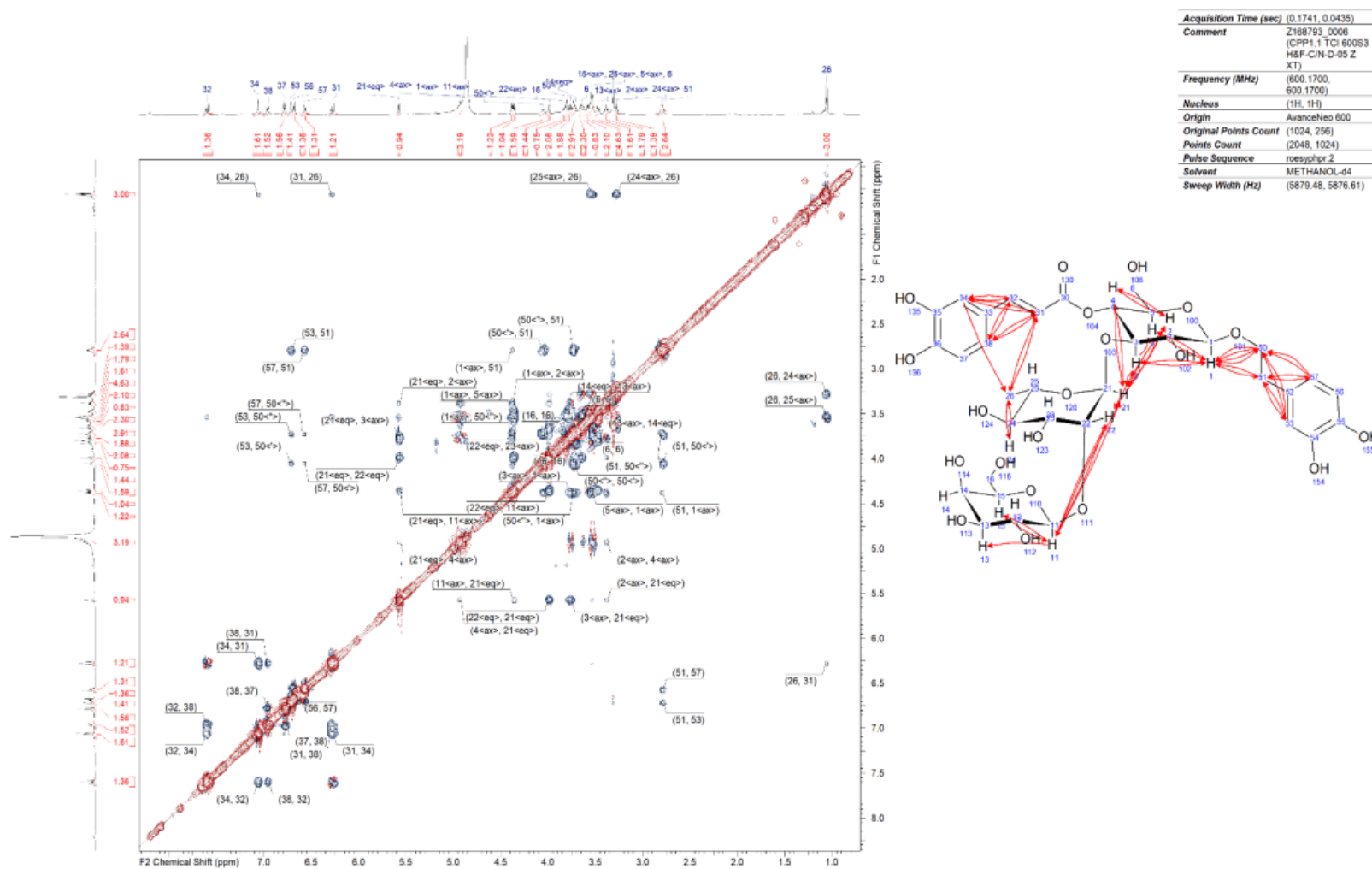
Prilog 13. ^{13}C NMR spektar polifenolne frakcije **teupoliozida** u metanolu- d_4 pri 25 °C

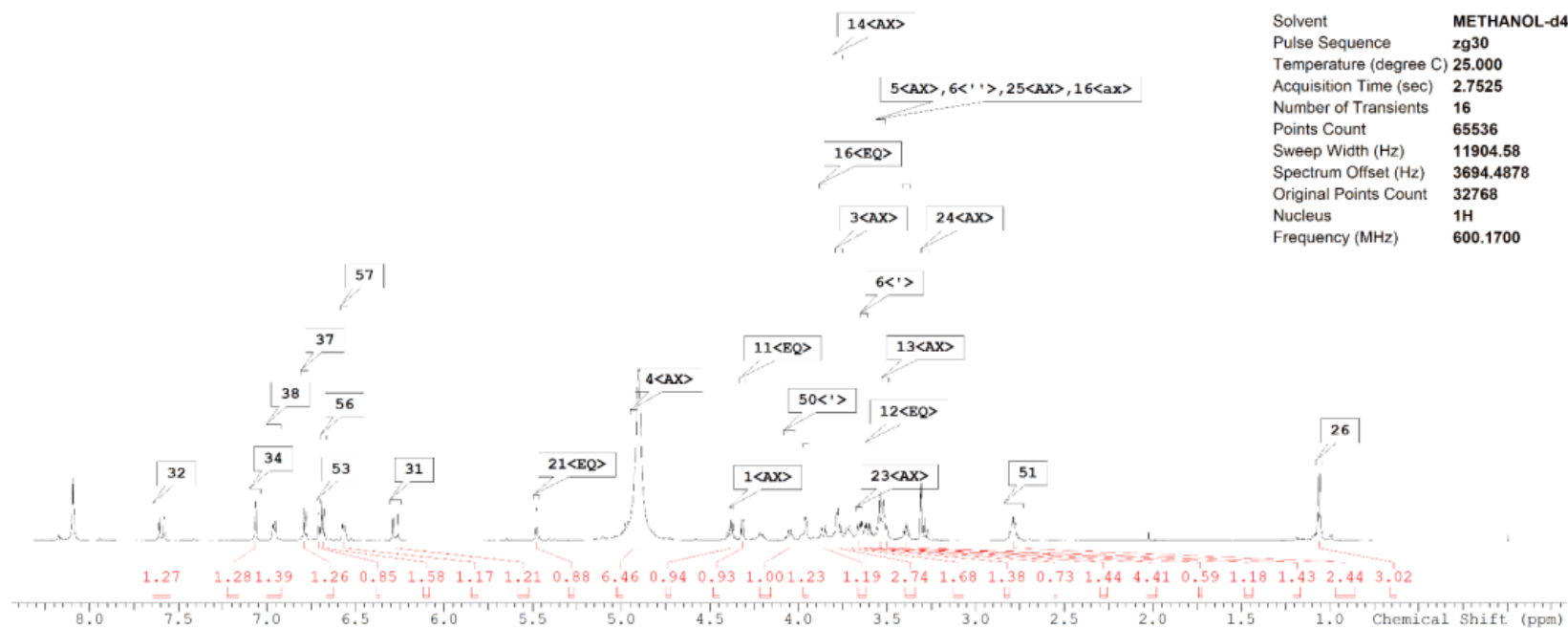


Prilog 14. COSY NMR spektar polifenolne frakcije **teupolizoida** u metanolu- d_4 pri 25 °C

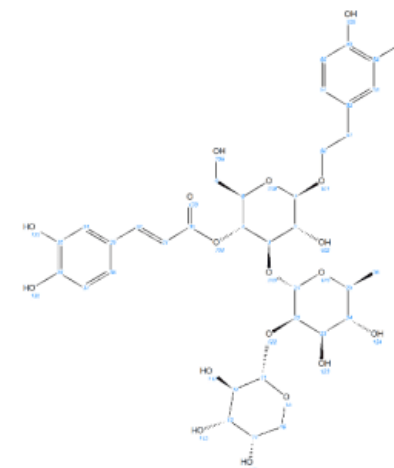


Prilog 16. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar polifenolne frakcije **teupolizida** u metanolu- d_4 pri 25 °C

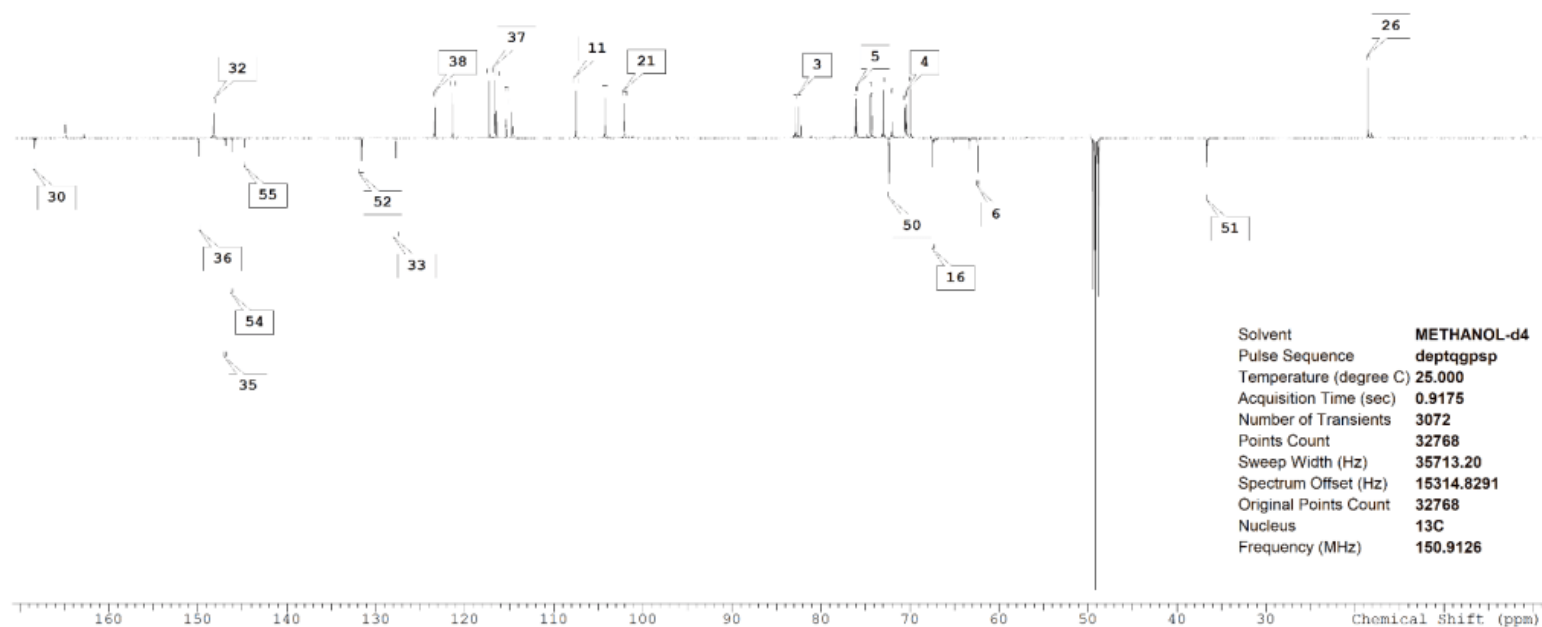
Prilog 17. NOESY NMR spektar polifenolne frakcije teupolizida u metanolu-d₄ pri 25 °C



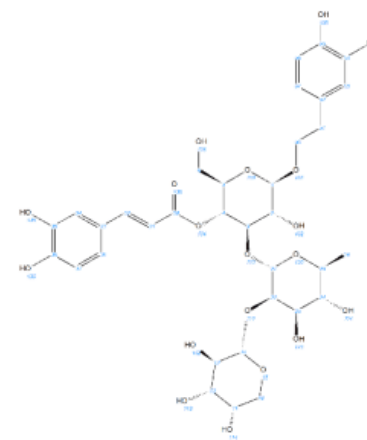
| Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|-------|-----------|-----------------------------|------------|--------------|-------|-------|----------|--------|------------|
| 1.063 | 3.000 | br d | 6.2 | 26 | M27 | 4.317 | 1.000 | d | 7.3 | 11<EQ> | M12 |
| 2.787 | 2.000 | m | - | 51 | M26 | 4.379 | 1.000 | br d | 7.8 | 1<AX> | M11 |
| 3.290 | 1.000 | t | 9.6 | 24<AX> | M25 | 4.925 | 1.000 | br s | 9.3 | 4<AX> | M10 |
| 3.392 | 1.000 | br t | 9.3, 7.8 | 2<AX> | M24 | 5.482 | 1.000 | s | - | 21<EQ> | M09 |
| 3.510 | 1.000 | br dd | 9.0, 3.3 | 13<AX> | M23 | 6.276 | 1.000 | d | 15.8 | 31 | M08 |
| 3.540 | 4.000 | m | - | 5<AX>, 6<'>, 25<AX>, 16<ax> | M22 | 6.568 | 1.000 | br dd | 8.0, 1.8 | 57 | M07 |
| 3.605 | 1.000 | br dd | 9.0, 7.4 | 12<EQ> | M21 | 6.684 | 1.000 | d | 8.0 | 56 | M06 |
| 3.633 | 1.000 | br dd | 13.6, 3.5 | 6<'> | M19 | 6.707 | 1.000 | d | 1.6 | 53 | M05 |
| 3.658 | 1.000 | br dd | 9.6, 3.3 | 23<AX> | M20 | 6.786 | 1.000 | d | 8.2 | 37 | M04 |
| 3.720 | 1.000 | q | 9.4 | 50<'> | M18 | 6.958 | 1.000 | br dd | 8.1, 1.9 | 38 | M03 |
| 3.775 | 1.000 | br t | 9.3 | 3<AX> | M16 | 7.065 | 1.000 | s | - | 34 | M02 |
| 3.783 | 1.000 | br s | - | 14<AX> | M17 | 7.594 | 1.000 | br d | 15.8 | 32 | M01 |
| 3.860 | 1.000 | br dd | 12.8, 2.1 | 16<EQ> | M15 | | | | | | |
| 3.961 | 1.000 | br dd | 3.0, 1.5 | 22<EQ> | M14 | | | | | | |
| 4.052 | 1.000 | q | 8.4 | 50<'> | M13 | | | | | | |



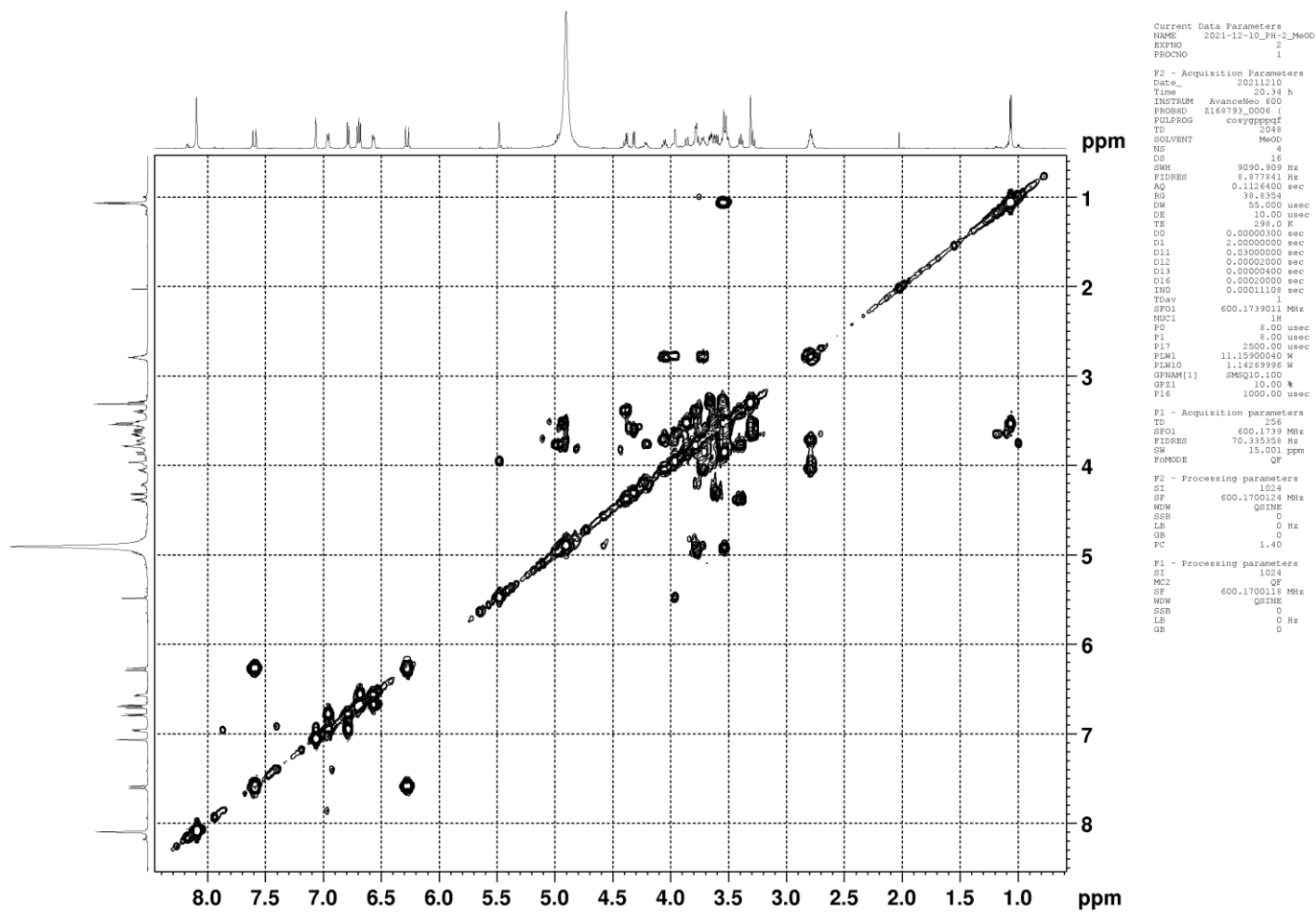
Prilog 18. ^1H NMR spektar polifenolne frakcije stahizoida A u metanolu- d_4 pri 25 °C



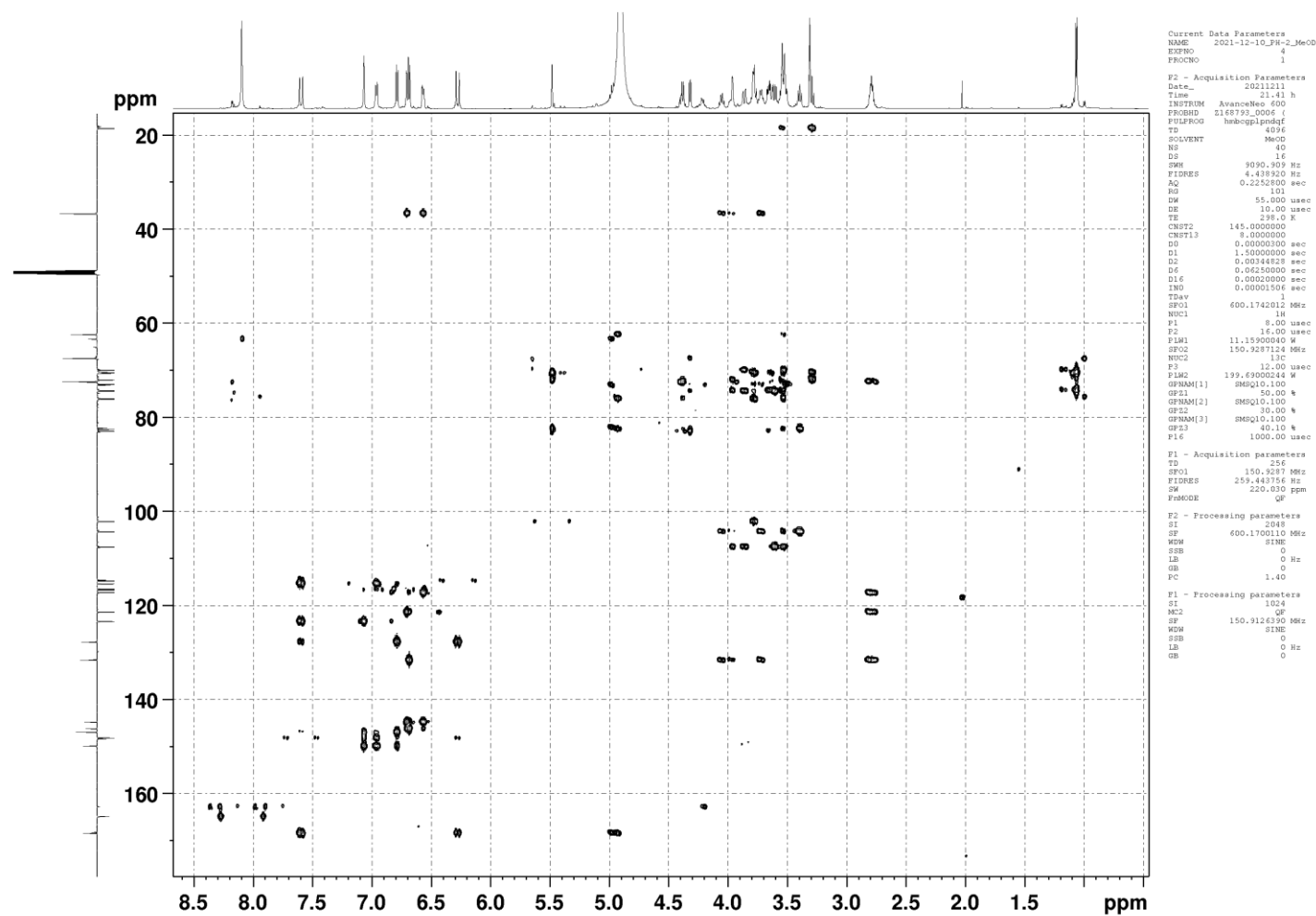
| Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|
| 18.546 | 1.000 | s | 26 | M34 | 82.888 | 1.000 | s | 22 | M19 | 146.898 | 1.000 | s | 35 | M03 |
| 36.652 | 1.000 | s | 51 | M33 | 102.106 | 1.000 | s | 21 | M18 | 148.133 | 1.000 | s | 32 | M06 |
| 62.413 | 1.000 | s | 6 | M32 | 104.258 | 1.000 | s | 1 | M17 | 149.859 | 1.000 | s | 36 | M02 |
| 67.440 | 1.000 | s | 16 | M31 | 107.552 | 1.000 | s | 11 | M16 | 168.420 | 1.000 | s | 30 | M01 |
| 69.953 | 1.000 | s | 14 | M30 | 114.781 | 1.000 | s | 31 | M15 | | | | | |
| 70.451 | 1.000 | s | 4 | M29 | 115.352 | 1.000 | s | 34 | M14 | | | | | |
| 70.574 | 1.000 | s | 25 | M28 | 116.442 | 1.000 | s | 56 | M13 | | | | | |
| 72.019 | 1.000 | s | 23 | M27 | 116.659 | 1.000 | s | 37 | M12 | | | | | |
| 72.286 | 1.000 | m | 50 | M26 | 117.258 | 1.000 | s | 53 | M11 | | | | | |
| 72.936 | 1.000 | s | 12 | M25 | 121.418 | 1.000 | s | 57 | M10 | | | | | |
| 74.294 | 1.000 | s | 24 | M24 | 123.375 | 1.000 | s | 38 | M09 | | | | | |
| 74.438 | 1.000 | s | 13 | M23 | 127.752 | 1.000 | s | 33 | M08 | | | | | |
| 76.034 | 1.000 | s | 5 | M22 | 131.616 | 1.000 | s | 52 | M07 | | | | | |
| 76.114 | 1.000 | s | 2 | M21 | 144.731 | 1.000 | s | 55 | M05 | | | | | |
| 82.484 | 1.000 | s | 3 | M20 | 146.190 | 1.000 | s | 54 | M04 | | | | | |



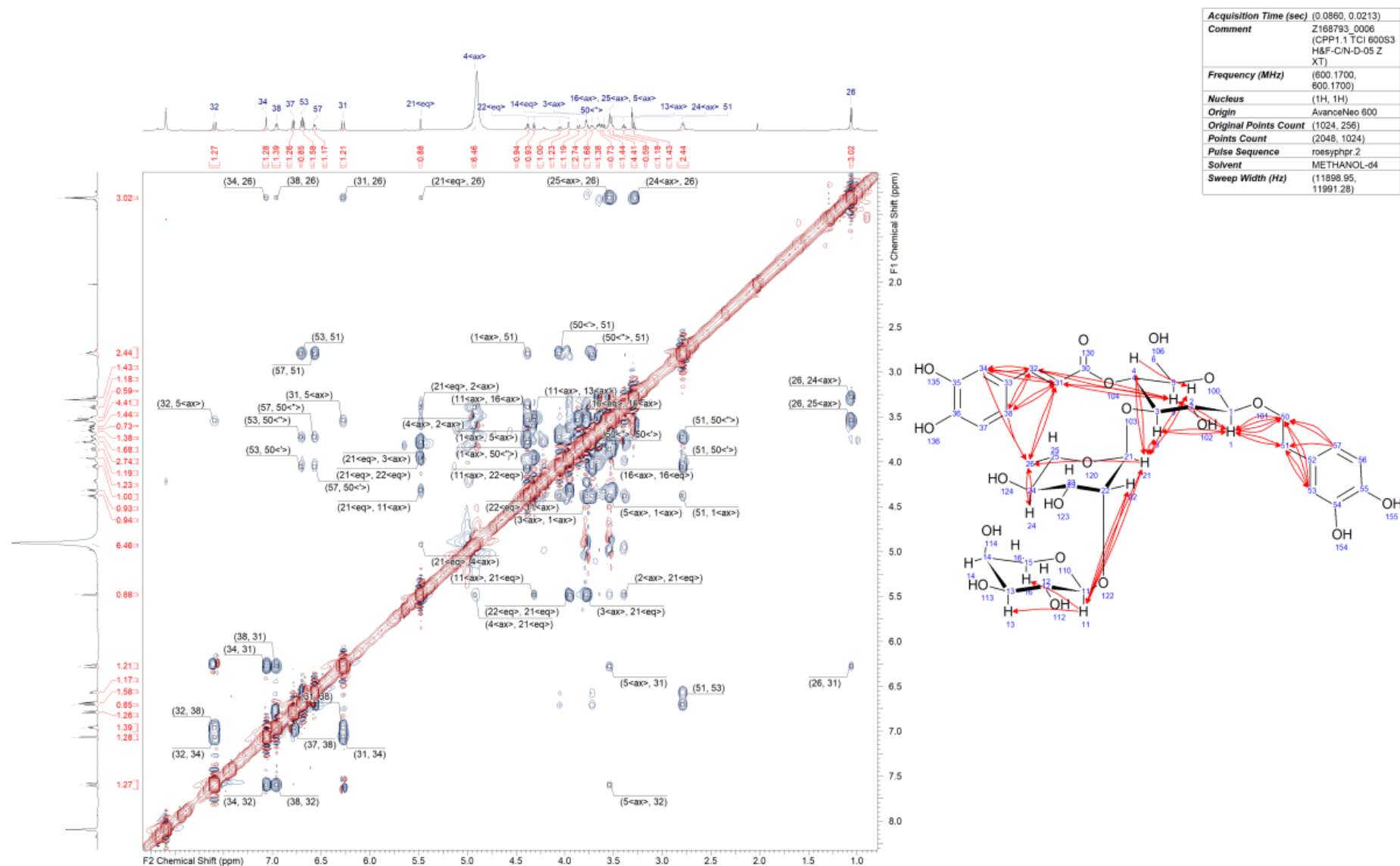
Prilog 19. ^{13}C NMR spektar polifenolne frakcije **stahizozida A** u metanolu- d_4 pri 25°



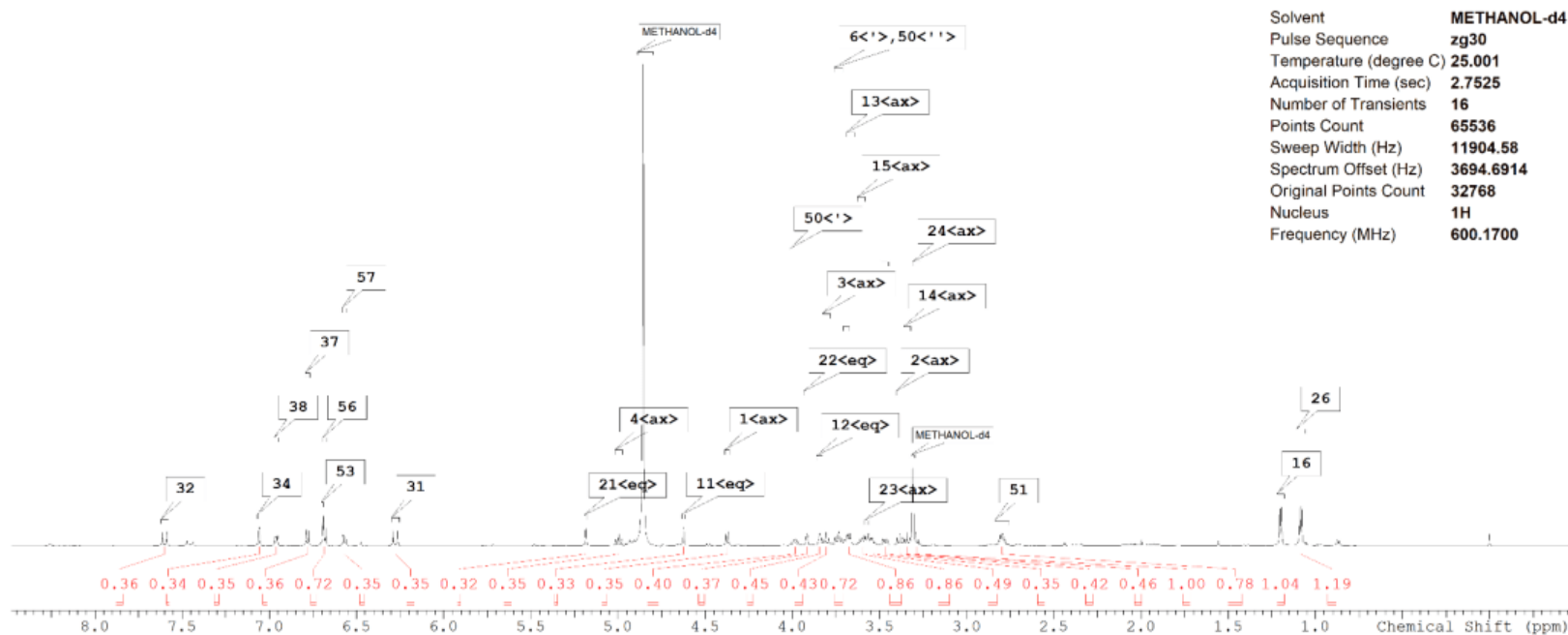
Prilog 20. COSY NMR spektar polifenolne frakcije **stahizoida A** u metanolu- d_4 pri 25 °C



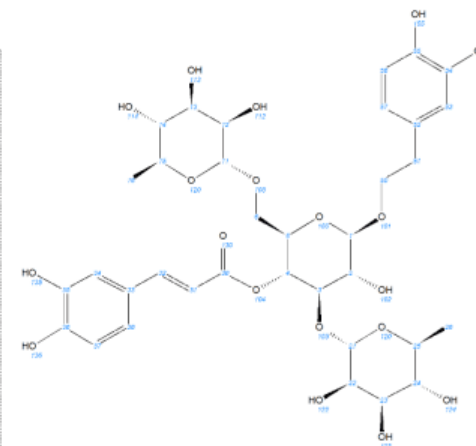
Prilog 22. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar polifenolne frakcije **stahizoida A** u metanolu- d_4 pri 25 °C



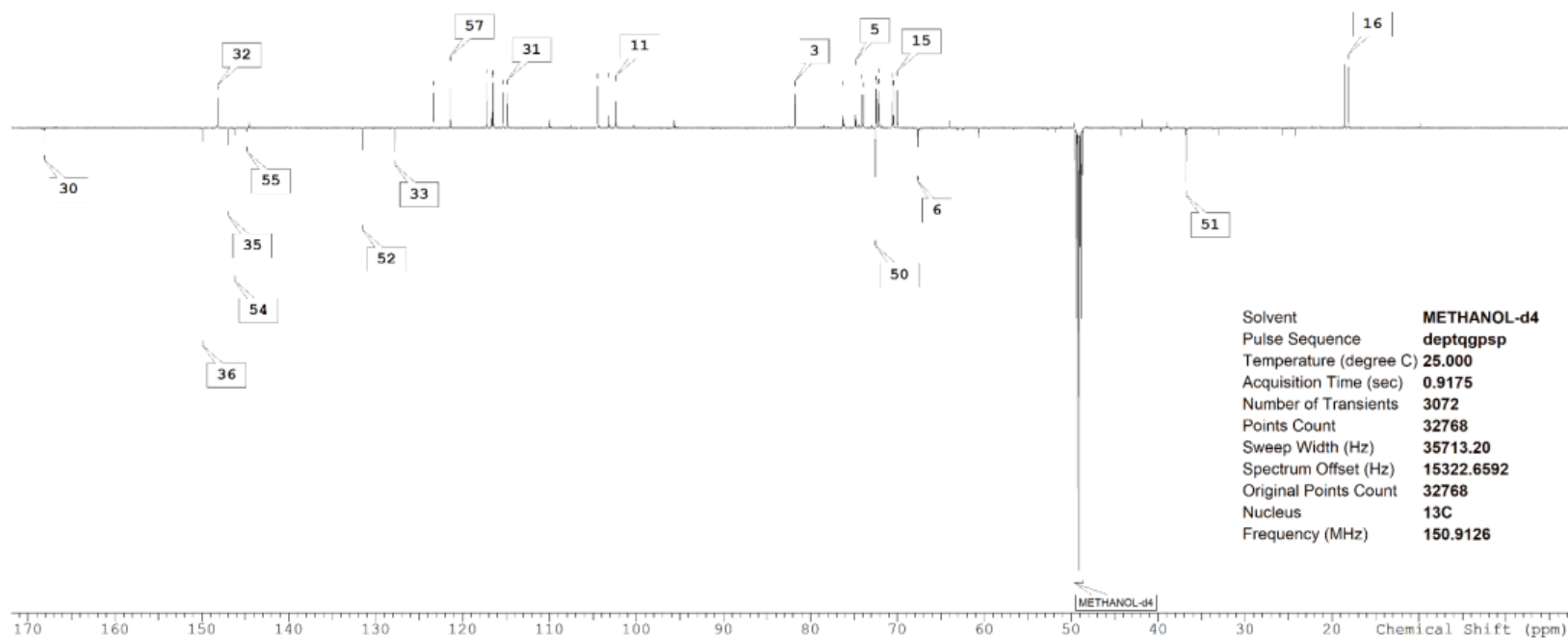
Prilog 23. NOESY NMR spektar polifenolne frakcije stahizoida A u metanolu-d₄ pri 25 °C



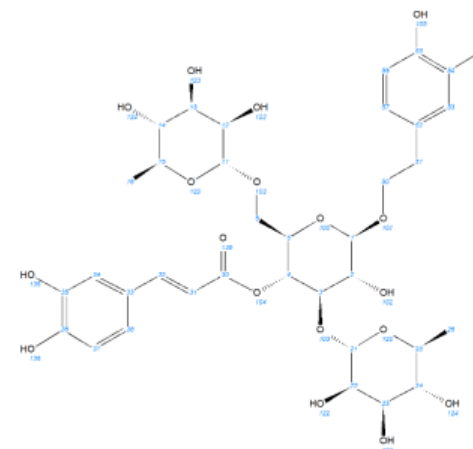
| Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Connected Atoms | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | H's | Type | J (Hz) | Connected Atoms | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|-------|---------------|-----------------|-------------|------------|--------------|-------|------|---------------|-----------------|--------|------------|
| 1.085 | 3.000 | d | 6.2 | 16 | 26 | M02 | 3.917 | 1.000 | dd | 3.0, 1.5 | - | 22<eq> | M10 |
| 1.201 | 3.000 | d | 6.2 | 26 | 16 | M03 | 3.986 | 1.000 | ddd | 9.5, 8.2, 6.9 | - | 50<'> | M13 |
| 2.799 | 2.000 | br s | - | - | 51 | M04 | 4.375 | 1.000 | d | 8.0 | 57 | 1<ax> | M11 |
| 3.292 | 1.000 | t | 9.4 | - | 24<ax> | M05 | 4.626 | 1.000 | d | 1.2 | - | 11<eq> | M12 |
| 3.343 | 1.000 | br t | 9.5 | - | 14<ax> | M06 | 4.996 | 1.000 | t | 9.6 | - | 4<ax> | M14 |
| 3.384 | 1.000 | t | 8.5 | - | 2<ax> | M28 | 5.185 | 1.000 | d | 1.1 | - | 21<eq> | M15 |
| 3.468 | 1.000 | dd | 11.4, 5.4 | - | 6<'> | M27 | 6.278 | 1.000 | d | 16.0 | - | 31 | M17 |
| 3.552 | 1.000 | dq | 9.3, 6.2 | - | 25<ax> | M07 | 6.571 | 1.000 | dd | 8.0, 1.6 | 1<ax>, 38 | 57 | M18 |
| 3.575 | 1.000 | dd | 8.7, 2.5 | - | 23<ax> | M29 | 6.684 | 1.000 | d | 7.9 | - | 56 | M19 |
| 3.601 | 1.000 | dq | 9.3, 6.2 | - | 15<ax> | M30 | 6.693 | 1.000 | d | 1.6 | - | 53 | M24 |
| 3.677 | 1.000 | br dd | 9.4, 3.5 | - | 13<ax> | M08 | 6.781 | 1.000 | d | 8.2 | 38 | 37 | M20 |
| 3.691 | 1.000 | ddd | 9.6, 4.4, 2.2 | - | 5<ax> | M26 | 6.960 | 1.000 | dd | 8.2, 1.8 | 37, 57 | 38 | M21 |
| 3.737 | 2.000 | m | - | - | 6<'>, 50<'> | M25 | 7.059 | 1.000 | d | 1.8 | - | 34 | M22 |
| 3.807 | 1.000 | t | 9.2 | - | 3<ax> | M09 | 7.601 | 1.000 | d | 15.8 | - | 32 | M23 |
| 3.843 | 1.000 | dd | 3.2, 1.5 | - | 12<eq> | M16 | | | | | | | |



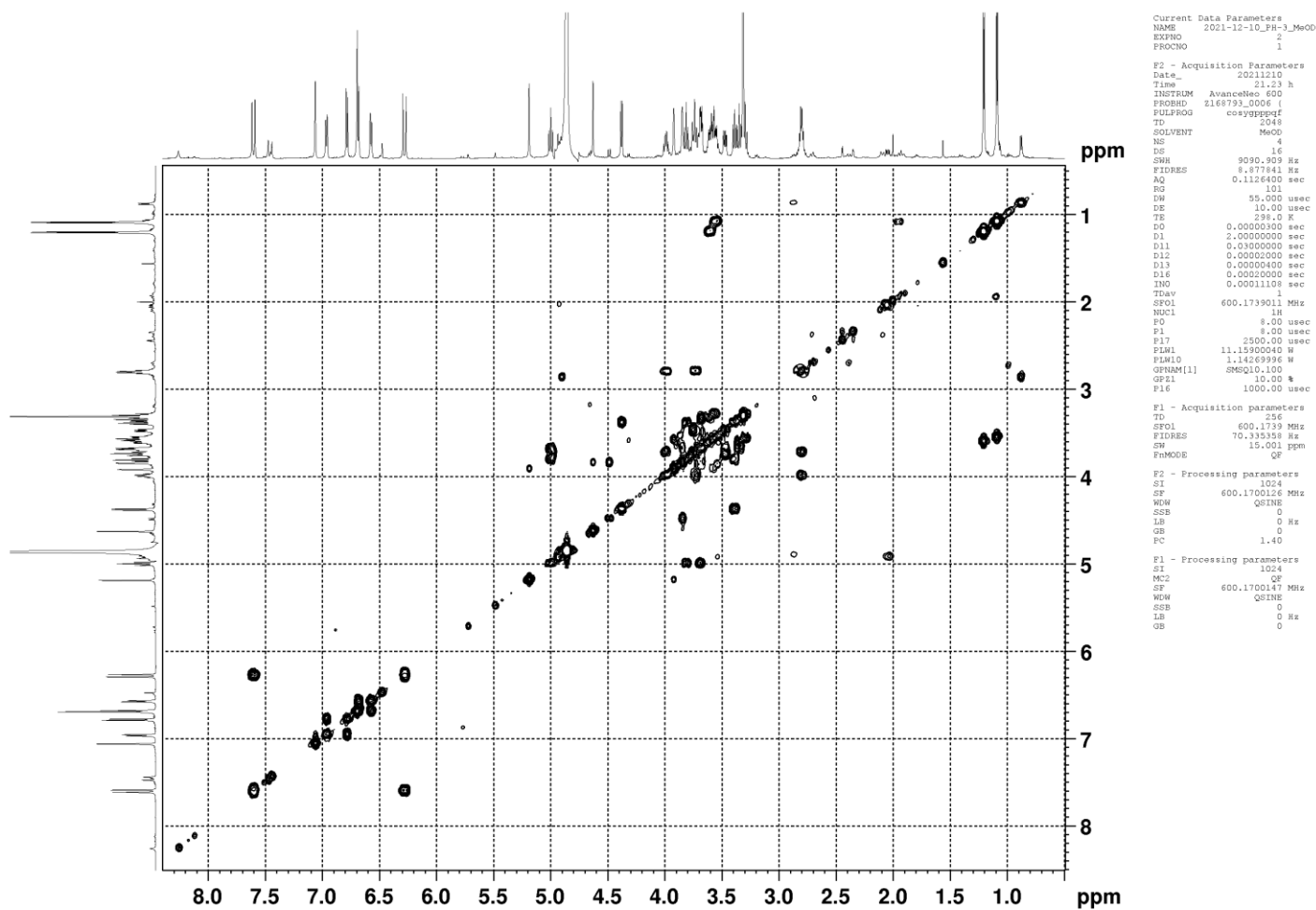
Prilog 24. ^1H NMR spektar polifenolne frakcije poliumozida u metanolu- d_4 pri 25 °C

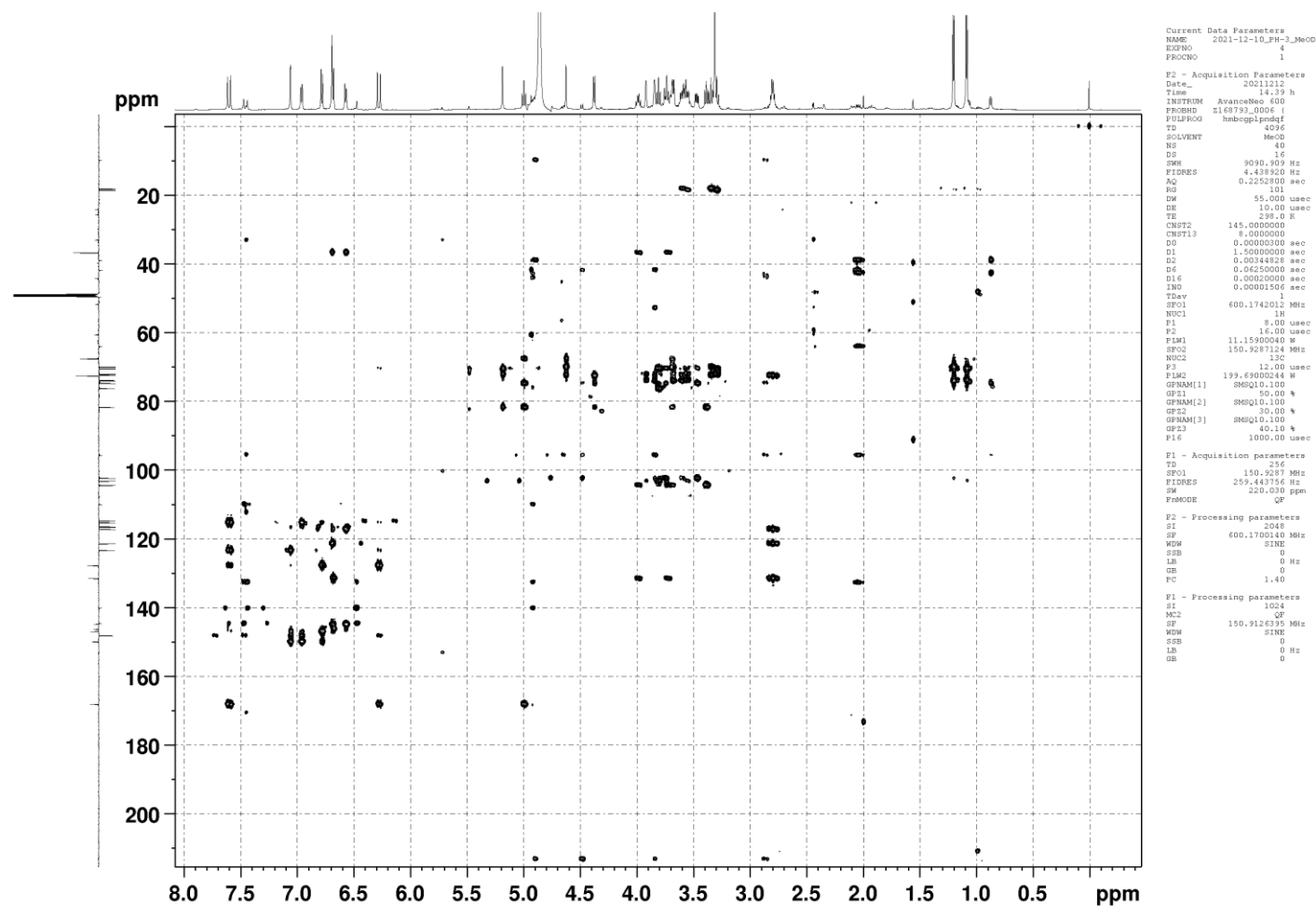


| Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 | Shift1 (ppm) | C's | Type | Atom1 | Multiplet1 |
|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|--------------|-------|------|-------|------------|
| 18.150 | 1.000 | s | 16 | M01 | 76.296 | 1.000 | s | 2 | M23 | 146.264 | 1.000 | s | 54 | M38 |
| 18.576 | 1.000 | s | 26 | M02 | 81.763 | 1.000 | s | 3 | M24 | 146.971 | 1.000 | s | 35 | M39 |
| 36.805 | 1.000 | s | 51 | M07 | 102.404 | 1.000 | s | 11 | M25 | 148.192 | 1.000 | s | 32 | M40 |
| 67.665 | 1.000 | s | 6 | M11 | 103.205 | 1.000 | s | 21 | M26 | 149.933 | 1.000 | s | 36 | M41 |
| 70.019 | 1.000 | s | 15 | M12 | 104.484 | 1.000 | s | 1 | M27 | 168.125 | 1.000 | s | 30 | M42 |
| 70.489 | 1.000 | s | 4 | M13 | 114.840 | 1.000 | s | 31 | M28 | | | | | |
| 70.576 | 1.000 | s | 25 | M14 | 115.367 | 1.000 | s | 34 | M29 | | | | | |
| 72.128 | 1.000 | s | 12 | M15 | 116.494 | 1.000 | s | 56 | M30 | | | | | |
| 72.186 | 1.000 | s | 23 | M16 | 116.646 | 1.000 | s | 37 | M31 | | | | | |
| 72.410 | 1.000 | s | 13 | M17 | 117.238 | 1.000 | s | 53 | M32 | | | | | |
| 72.475 | 1.000 | s | 22 | M18 | 121.412 | 1.000 | s | 57 | M33 | | | | | |
| 72.569 | 1.000 | s | 50 | M19 | 123.377 | 1.000 | s | 38 | M34 | | | | | |
| 73.891 | 1.000 | s | 24 | M20 | 127.789 | 1.000 | s | 33 | M35 | | | | | |
| 74.071 | 1.000 | s | 14 | M21 | 131.531 | 1.000 | s | 52 | M36 | | | | | |
| 74.837 | 1.000 | s | 5 | M22 | 144.841 | 1.000 | s | 55 | M37 | | | | | |

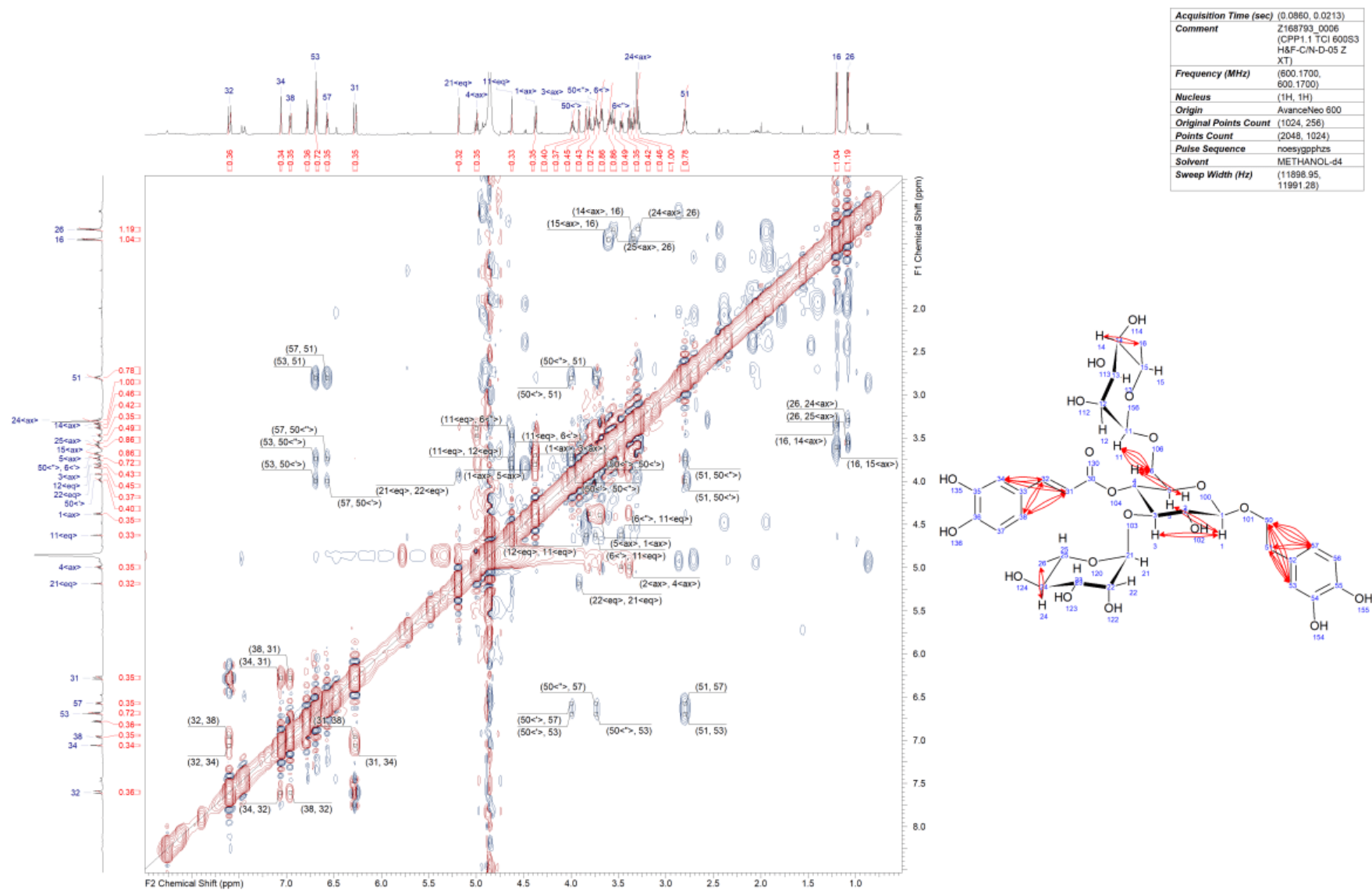


Prilog 25. ^{13}C NMR spektar polifenolne frakcije **poliumozida** u metanolu- d_4 pri $25\text{ }^\circ\text{C}$

Prilog 26. COSY NMR spektar polifenolne frakcije **poliumozida** u metanolu-d₄ pri 25 °C



Prilog 28. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar polifenolne frakcije **poliumozida** u metanolu- d_4 pri 25 °C



Prilog 30. Usporedba protonskih kemijskih pomaka za sve analizirane polifenolne frakcije u deuteriranom metanolu pri 25 °C (najveće razlike označene su simbolom *)

| | proton | ehinakozid | verbaskozid | teupoliozid | stahizozid A | poliumozid |
|---------------------------|---------------|------------|-------------|-------------|--------------|------------|
| β-D-glukopiranoza | 1<AX> | 4,39 | 4,38 | 4,38 | 4,38 | 4,37 |
| | 2<AX> | 3,40 | 3,39 | 3,38 | 3,39 | 3,38 |
| | 3<AX> | 3,81 | 3,82 | 3,77 | 3,78 | 3,81 |
| | 4<AX> | 5,01 | 4,92* | 4,93* | 4,93* | 5,00 |
| | 5<AX> | 3,77 | 3,54* | 3,54* | 3,54* | 3,69 |
| | 6<'> | 3,94 | 3,62* | 3,64* | 3,63* | 3,47* |
| | 6<''> | 3,64 | 3,52* | 3,54* | 3,54* | 3,74* |
| sekundarni šećer | 11 | 4,30 | n/a | 4,36 | 4,32 | 4,63* |
| | 12 | 3,21 | n/a | 3,58* | 3,61* | 3,84* |
| | 13 | 3,34 | n/a | 3,47* | 3,51* | 3,68* |
| | 14 | 3,28 | n/a | 3,81* | 3,78* | 3,34 |
| | 15 | 3,22 | n/a | 3,54* | n/a | 3,60 |
| | 16<'> | 3,83 | n/a | 3,82 | 3,86* | 1,20 |
| | 16<''> | 3,65 | n/a | 3,72 | 3,54* | n/a |
| α-L-ramnoza | 21<EQ> | 5,18 | 5,19 | 5,57* | 5,48* | 5,18 |
| | 22<EQ> | 3,92 | 3,92 | 3,99* | 3,96* | 3,92 |
| | 23<AX> | 3,57 | 3,57 | 3,66* | 3,66* | 3,58 |
| | 24<AX> | 3,29 | 3,29 | 3,28 | 3,29 | 3,29 |
| | 25<AX> | 3,55 | 3,57 | 3,54 | 3,54 | 3,55 |
| | 26 | 1,09 | 1,09 | 1,05 | 1,06 | 1,08 |
| kafeinska kiselina | 31 | 6,28 | 6,28 | 6,28 | 6,28 | 6,28 |
| | 32 | 7,60 | 7,60 | 7,60 | 7,59 | 7,60 |
| | 34 | 7,06 | 7,06 | 7,06 | 7,07 | 7,06 |
| | 37 | 6,78 | 6,78 | 6,78 | 6,79 | 6,78 |
| | 38 | 6,96 | 6,96 | 6,96 | 6,96 | 6,96 |
| hidroksitirozol | 50<'> | 4,04 | 4,05 | 4,05 | 4,05 | 3,99 |
| | 50<''> | 3,73 | 3,72 | 3,72 | 3,72 | 3,74 |
| | 51 | 2,80 | 2,79 | 2,79 | 2,79 | 2,80 |
| | 53 | 6,71 | 6,70 | 6,71 | 6,71 | 6,69 |
| | 56 | 6,68 | 6,68 | 6,68 | 6,68 | 6,68 |
| | 57 | 6,58 | 6,57 | 6,57 | 6,57 | 6,57 |

Prilog 31. Usporedba ugljikovih kemijskih pomaka za sve analizirane polifenolne frakcije u deuteriranom metanolu pri 25 °C (najveće razlike označene su simbolom *)

| | ugljik | ehinakozid | verbaskozid | teupoliozid | stahizozid A | poliumozid |
|---|--------|------------|-------------|-------------|--------------|------------|
| β-D-glukopiranoza | 1 | 104,3 | 104,3 | 104,2 | 104,3 | 104,5 |
| | 2 | 76,3 | 76,3 | 76,3 | 76,1 | 76,3 |
| | 3 | 81,8 | 81,8 | 83,1 | 82,5 | 81,8 |
| | 4 | 70,7 | 70,7 | 70,5 | 70,5 | 70,5 |
| | 5 | 74,8 | 76,2 | 76,1 | 76,0 | 74,8 |
| | 6 | 69,5 | 62,5* | 62,4* | 62,4* | 67,7* |
| sekundarni šećer | 11 | 104,8 | n/a | 107,7* | 107,6* | 102,4* |
| | 12 | 75,2 | n/a | 73,0* | 72,9* | 72,1 |
| | 13 | 77,9 | n/a | 75,0* | 74,4* | 72,4 |
| | 14 | 71,6 | n/a | 70,5* | 70,0* | 74,1 |
| | 15 | 78,0 | n/a | 77,1 | | 70,0 |
| | 16 | 62,7 | n/a | 63,0 | 67,4* | 18,2 |
| α-L-ramnoza | 21 | 103,2 | 103,2 | 102,5 | 102,1 | 103,2 |
| | 22 | 72,5 | 72,5 | 83,2* | 82,9* | 72,5 |
| | 23 | 72,2 | 72,2 | 71,9 | 72,0 | 72,2 |
| | 24 | 73,9 | 73,9 | 74,2 | 74,3 | 73,9 |
| | 25 | 70,6 | 70,6 | 70,5 | 70,6 | 70,6 |
| | 26 | 18,6 | 18,6 | 18,6 | 18,5 | 18,6 |
| kafeinska kiselina | 30 | 168,6 | 168,4 | 168,4 | 168,4 | 168,1 |
| | 31 | 114,8 | 114,8 | 114,8 | 114,8 | 114,8 |
| | 32 | 148,4 | 148,2 | 148,1 | 148,1 | 148,2 |
| | 33 | 127,8 | 127,8 | 127,8 | 127,8 | 127,8 |
| | 34 | 115,4 | 115,4 | 115,3 | 115,4 | 115,4 |
| | 35 | 147,0 | 146,3 | 147,0 | 146,9 | 147,0 |
| | 36 | 150,0 | 149,9 | 149,9 | 149,9 | 149,9 |
| | 37 | 116,7 | 116,6 | 116,7 | 116,7 | 116,6 |
| 38 | 123,4 | 123,4 | 123,4 | 123,4 | 123,4 | |
| hidroksitirozol | 50 | 72,5 | 72,4 | 72,3 | 72,3 | 72,6 |
| | 51 | 36,7 | 36,7 | 36,6 | 36,7 | 36,8 |
| | 52 | 131,6 | 131,6 | 131,7 | 131,6 | 131,5 |
| | 53 | 117,3 | 117,2 | 117,3 | 117,3 | 117,2 |
| | 54 | 146,2 | 147,0 | 146,2 | 146,2 | 146,3 |
| | 55 | 144,8 | 144,8 | 144,8 | 144,7 | 144,8 |
| | 56 | 116,5 | 116,4 | 116,4 | 116,4 | 116,5 |
| | 57 | 121,5 | 121,4 | 121,4 | 121,4 | 121,4 |

Prilog 32. Usporedba konstantni sprega ${}^nJ_{H,H}$ (Hz) za sve analizirane polifenolne frakcije u deuteriranom metanolu - d_4 pri 25 °C (najveće razlike označene su simbolom *)

| | proton | ehinakozid | verbaskozid | teupoliozid | stahizozid A | poliumozid |
|---|----------|------------|-------------|-----------------------------|--------------|-------------|
| β-D-glukopiranoza | 1, 2 | 7,8 | 7,8 | 8,0 | 7,8 | 8,0 |
| | 2, 3 | 9,3 | 9,2 | 9,1 | 9,3 | 9,2 |
| | 3, 4 | 9,6 | 9,5 | 9,3 | 9,3 | 9,6 |
| | 4, 5 | 9,6 | 9,5 | 9,3 | 9,3 | 9,6 |
| | 5, 6a | 2,2 | <1* | preklapanje | 3,5 | 2,2 |
| | 5, 6b | 5,5 | 5,8 | preklapanje | preklapanje | 5,5 |
| | 6a, 6b | 11,4 | 10,2 | 12,4 | 13,6 | 11,4 |
| sekundarni šećer | 11, 12 | 7,6 | n/a | 7,6 | 7,3 | 1,5 |
| | 12, 13 | 9,3 | n/a | 9,6 | 9,0 | 3,2 |
| | 13, 14 | 9,1 | n/a | 3,4* | 3,3* | 9,5 |
| | 14, 15 | 9,0 | n/a | preklapanje (ca 2-3 Hz)* | n/a | 9,3 |
| | 15, 16a | 2,3 | n/a | 7,3 | n/a | 6,2 |
| | 15, 16b | 5,6 | n/a | overlap | n/a | n/a |
| | 16a, 16b | 11,9 | n/a | 11,4 | 12,8* | n/a |
| | 14, 16a | n/a | n/a | n/a | 2,1* | n/a |
| 14, 16b | n/a | n/a | n/a | preklapanje (ca 3-4 Hz)* | n/a | |
| α-L-ramnoza | 21, 22 | 1,6 | 1,6 | 1,3 | 1,5 | 1,5 |
| | 22, 23 | 3,3 | 3,2 | 3,1 | 3,3 | 3,0 |
| | 23, 24 | 9,5 | 9,6 | 9,6 | 9,6 | 9,5 |
| | 24, 25 | 9,6 | 9,6 | 9,6 | 9,6 | 9,3 |
| | 25, 26 | 6,2 | 6,2 | 6,0 | 6,2 | 6,2 |
| kafeinska kiselina | 31, 32 | 15,8 | 15,8 | 15,8 | | 15,8 |
| | 34, 38 | 2,0 | 2,0 | 1,8 | 1,9 | 1,8 |
| | 37, 38 | 8,3 | 8,2 | 8,2 | 8,2 | 8,2 |
| hidroksitirozol | 50a, 50b | 9,6 | 9,6 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| | 50a, 51a | 7,0; 8,1 | 6,7; 8,3 | 6,7; 7,8 | 8,4 | 8,17; 6,9 |
| | 50a, 51b | | | | 8,4 | |
| | 50b, 51a | 6,7; 8,2 | 6,8; 8,3 | preklapanje | 9,5 | preklapanje |
| | 50b, 51b | | | preklapanje | 9,5 | preklapanje |
| | 53, 57 | 2,2 | 2,0 | 1,8 | 1,8 | 1,6 |
| | 56, 57 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 |

Životopis

Ana Mandura Jarić rođena je 10. srpnja 1993. u Slavonskom Brodu. Pohađala je Prvu Gimnaziju u Osijeku gdje je maturirala 2012. godine. Akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije stekla je 2016., a 2018. godine je diplomirala i tako stekla akademski naziv magistre inženjerke prehrambenog inženjerstva. Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2020. godine. Od 2020. godine zaposlena je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu kao asistent na znanstvenom projektu „Hrvatske Zaklade za Znanost“ pod nazivom „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“.

Aktivno je sudjelovala u radu sa studentima i u praktičnoj nastavi kroz održavanje laboratorijskih vježbi, te kao pomoć pri izradi 4 završna i 4 diplomska radova. Autorica je 4 A1 znanstvena rada, 1 A2 i 1 A3 znanstvenog rada. Koautorica je 19 znanstvenih radova i jednog poglavlja u knjizi. Sudjelovala je na međunarodnim kongresima s više od 10 posterskih priopćenja i jednim usmenim izlaganjem. U sklopu istoimenog projekta položila je LabAnim tečaj kategorije B za osposobljavanje rada s pokusnim životinjama na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Predmet istraživačkog rada kandidatkinje uključuje ekstrakcijske tehnike, formuliranje inkapsuliranih dozirnih sustava polifenolnih spojeva te razvoj funkcionalnih konditorskih proizvoda.

Popis objavljenih znanstvenih radova, poglavlja u knjigama i kongresnih priopćenja:

1) Znanstveni radovi objavljeni u objavljeni u časopisima indeksiranim u Web of Science Core Collection/Current Contents

Mandura Jarić, A., Haramustek, L., Nižić Nodilo, L., Vrsaljko, D., Petrović, P., Kuzmić, S., Jozinović, A., Aladić, K., Jokić, S., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2024) A novel approach to serving plant-based confectionery - The employment of spray drying in the production of carboxymethyl cellulose-based delivery systems enriched with *Teucrium montanum* L. extract. *Foods* **13**, 372.

Vojvodić Cebin, A., Bunić, M., **Mandura Jarić, A.**, Šeremet, D., Komes, D. (2023) Physicochemical and sensory stability evaluation of gummy candies fortified with mountain germander extract and prebiotics. *Polymers* **16**, 259.

Šeremet, D., Durgo, K., Kosanović, J., Huđek Turković, A., **Mandura Jarić, A.**, Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) Studying the functional potential of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract using *in vitro* methodology. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 16975.

Mandura Jarić, A., Čikoš, A., Pocrnić, M., Aladić, K., Jokić, S., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) *Teucrium montanum* - Unrecognized source of phenylethanoid glycosides: green extraction approach and elucidation of phenolic compounds via NMR and UHPLC-HR MS/MS. *Antioxidants* **12**, 1903.

Kraljić, K., Škevin, D., Čukelj Mustač, N., Benković, M., Drakula, S., Balbino, S., **Mandura Jarić, A.**, Mamilović, K., Ramljak, I., Ćurić, D. (2023) Influence of Cryogenic Grinding on the Nutritional and Antinutritional Components of Rapeseed Cake. *Appl. Sci.* **13**, 5841.

Šeremet, D., Durgo, K., Komljenović, A., Antolić, M., **Mandura Jarić, A.**, Huđek Turković, A., Komes, D., Šantek, B. (2022) Red beetroot and banana peels as value-added ingredients: assessment of biological activity and preparation of functional edible films. *Polymers* **14**, 4724.

Šeremet, D., Štefančić, M., Petrović, P., Kuzmić, S., Doroci, S., **Mandura Jarić, A.**, Vojvodić Cebin, A., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Development, characterization and incorporation of alginate-plant protein covered liposomes containing ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract into candies. *Foods* **11**, 1816.

Šeremet, D., Jokić, S., Aladić, K., Butorac, A., Lovrić, M., Jurinjak Tušek, A., Obranović, M., **Mandura Jarić, A.**, Vojvodić Cebin, A., Carović-Stanko, K., Komes, D. (2022) Comprehensive study of traditional plant ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) grown in Croatia in terms of nutritional and bioactive composition. *Foods* **11**, 658.

Šeremet, D., Fabečić, P., Vojvodić Cebin, A., **Mandura Jarić, A.**, Pudić, R., Komes D. (2022) Antioxidant and sensory assessment of innovative coffee blends of reduced caffeine content. *Molecules* **27**, 448.

Šeremet, D., Vugrinec, K., Petrović, P., Butorac, A., Kuzmić, S., Vojvodić Cebin, A., **Mandura, A.**, Lovrić, M., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chem.* **370**, 131257.

Mandura Jarić, A., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) The multiple-response modeling of heat-assisted, microwave-assisted and subcritical water extraction on selected phenolics from traditional plant species *Teucrium montanum*. *Prep. Biochem. Biotech.* **52**, 1-13.

Šeremet, D., Jokić, S., Aladić, K., Vojvodić Cebin, A., Božac, N., **Mandura, A.**, Komes, D. (2021) Optimization of heat-, microwave-assisted and subcritical water extraction of phenolic compounds from ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using response surface methodology. *JARMAP* **25**, 100346.

Šeremet, D., Karlović, S., Vojvodić Cebin, A., **Mandura, A.**, Ježek, D., Komes, D. (2021) Extraction of bioactive compounds from different types of tea by high hydrostatic pressure. *J. Food Process. Pres.* **45**, 9, e15751.

Šeremet, D., **Mandura, A.**, Vojvodić Cebin, A., Martinić, A., Galić, K., Komes, D. (2020) Challenges in confectionery industry: development and storage stability of innovative white tea-based candies. *J. Food Sci.* **85**, 2060-2068.

Šeremet, D., Durgo, K., Jokić, S., Huđek, A., Vojvodić Cebin, A., **Mandura, A.**, Jurasović, J., Komes, D. (2020) Valorization of banana and red beetroot peels: determination of basic macrocomponent composition, application of novel extraction methodology and assessment of biological activity *in vitro*. *Sustainability* **12**, 4539.

Mandura, A., Šeremet, D., Ščetar, M., Vojvodić Cebin, A., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D. (2020) Physico-chemical, bioactive, and sensory assessment of white tea- based candies during 4-months storage. *J. Food Process. Pres.* **44**, e14628.

Režek Jambrak, A., Šimunek, M., Grbeš, F., **Mandura, A.**, Djekic, I. (2018) Analysis of apple beverages treated with high-power ultrasound: a quality function deployment approach. *J. Sci. Food Agr.* **98**, 2258-2266.

2) Poglavlja u knjigama:

Komes, D., Šeremet, D., **Mandura, A.**, Vojvodić Cebin, A. (2021) Valorizacija bioaktivnog potencijala nusproizvoda kave. *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3* (Šubarić, D., Miličević, B., ur.), Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet, str. 207-237.

3) Radovi indeksirani u sekundarnim publikacijama

Šeremet, D., Subotić, P., Marković, K., **Mandura Jarić, A.**, Vojvodić Cebin, A., Vahčić, N., Komes, D. (2023) Development, bioactive and sensory analysis of the honey-filled chocolate pralines infused with ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 18, 49-54.

Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., **Mandura Jarić, A.**, Komes, Draženka (2021) Valorisation of *Teucrium montanum* as a source of valuable natural compounds: Bioactive content, antimicrobial and biological activity – A review. *Phcog. Rev.* **15**, 191-198.

Mandura, A., Pasquino Natucci, M., Cazalens, E., Šeremet, D., Pudić, R., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2021) The assessment of bioactive potential and sensory acceptability of coffee and its byproducts - cascara and silverskin. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 16, 35-40.

Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., **Mandura, A.**, Žepić, I., Marković, K., Komes, D. (2020) An insight into the chemical composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) by means of macrocomponent analysis and fractionation of phenolic compounds. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 15, 133- 138.

Šeremet, D., **Mandura, A.**, Vojvodić Cebin, A., Oskomić, M., Champion, E., Martinić, A., Komes, D. (2019) Ruby chocolate - bioactive potential and sensory quality characteristics compared with dark, milk and white chocolate. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 8, 89-96.

3) Radovi u domaćim i međunarodnim zbornicima

Mandura Jarić, A., Miletić, L., Kuzmić, S., Sander, A., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) Electrospun nanofibres as an emerging delivery system for phenylethanoid glycosides: preparation and *in vitro* evaluation. *Proceedings - 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists* (Komes, D., Vidaček Filipec, S., Voučko, B., ur.), Zagreb, Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, str. 5-9.

Šeremet, D., **Mandura, A.**, Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) Development and characterization of dopamine-loaded liposomes extracted from banana peel. *Proceedings - 18th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry"* (Jukić, A., Očelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.), Zagreb i Osijek, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) i Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 132-140.

Šeremet, D., **Mandura, A.**, Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) Influence of conventional and innovative extraction techniques on bioactive properties of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Proceedings - 18th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry"* (Jukić, A., Očelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.), Zagreb i Osijek, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) i Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 125-131.