

Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata, mikrokapsula i emulzija biljaka iz porodice Lamiaceae

Bila, Zoran

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:845517>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Zoran Bila

1219/PI

**FIZIKALNA I KEMIJSKA
SVOJSTVA EKSTRAKATA,
MIKROKAPSULA I EMULZIJA
BILJAKA IZ PORODICE *Lamiaceae***

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

ZAHVALA

Neizmjerno sam zahvalan svome mentoru doc.dr.sc. Davoru Valingeru na iskazanom trudu, razumijevanju i pristupačnosti koju mi je ukazao tijekom izrade diplomskog rada. Također, hvala doc.dr.sc. Maji Benković, kao i svim djelatnicima Laboratorija za mjerenja, regulaciju i automatizaciju, na uslužnosti i uloženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Posebna zahvala svim dragim prijateljima, a najviše mojim roditeljima i bratu koji su mi sve ovo omogućili i koji su me uvijek podržavali tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA, MIKROKAPSULA I EMULZIJA BILJAKA IZ PORODICE *Lamiaceae*

Zoran Bila, 1219/PI

Sažetak: U posljednje vrijeme u polju znanosti o hrani sve se više budi zanimanje za samoniklo ljekovito bilje, koje je dugo bilo značajno uglavnom samo u tradicionalnoj medicini. Ovo istraživanje je provedeno sa ciljem da se ispita kakav utjecaj na fizikalna i kemijska svojstva biljnih ekstrakata imaju postupci emulgiranja i mikroinkapsuliranja. Za pripremu ekstrakata korišteno je 5 biljaka iz porodice *Lamiaceae*: paprena metvica, matičnjak, kadulja, majčina dušica i lavanda. Početnim ekstraktima, ekstraktima vezanim na mikrokapsule, ekstraktima nakon adsorpcije i emulzijama ulja u vodenom ekstraktu ispitana su fizikalna svojstva te antioksidacijska aktivnost i udio polifenola. U većini ispitivanja antioksidacijske aktivnosti prema DPPH, FRAP i Briggs-Rauscher metodama utvrđena je najviša antioksidacijska aktivnost za matičnjak kao i najveći udio polifenola. Ista ispitivanja pokazala su najniže vrijednosti za ekstrakte majčine dušice, osim u slučaju Briggs-Rauscher metode, kada je najmanju antioksidacijsku aktivnost imao uzorak lavande. Osim izravnih određivanja spomenutih svojstava, korištena je i blisko-infracrvena spektroskopija u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama kako bi se ustanovilo slaganje rezultata. Za ekstrakte prije i nakon adsorpcije model se pokazao kao pogodan za kvantitativnu procjenu obzirom da su vrijednosti koeficijenta determinacije iznosile više od 0,9.

Glavne riječi: *Lamiaceae*, antioksidacijska aktivnost, mikrokapsule, emulzije, blisko-infracrvena spektroskopija

Rad sadrži: 62 stranice, 14 slika, 15 tablica, 89 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Davor Valinger

Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Maja Benković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
2. Doc.dr.sc. Davor Valinger
3. Doc.dr.sc. Maja Benković
4. Izv.prof.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF EXTRACTS, MICROCAPSULES AND EMULSIONS OF PLANTS FROM THE *Lamiaceae* FAMILY

Zoran Bila, 1219/PI

Abstract: *Recently, in the field of food science, there has been an increasing interest in wild medicinal herbs, which have previously been significant mainly in traditional medicine. This study was conducted with the goal to examine what effect different procedures performed on plant extracts may have on physical and chemical properties. For the preparation of extracts, five plants of the Lamiaceae family were used: peppermint, lemon balm, sage, thyme and lavender. Initial extracts, microcapsule-bound extracts, post-adsorption extracts and emulsions of oil in the aqueous extract were tested for physical properties as well as antioxidant activity and polyphenol content. In most cases according to DPPH, FRAP and Briggs-Rauscher methods, the highest antioxidant activity was noted for lemon balm, as well as the highest content of polyphenols. The same tests showed the lowest values for thyme extracts, except in the case of the Briggs-Rauscher method, where the lavender sample had the lowest antioxidant activity. In addition to direct methods of determining mentioned properties, near-infrared spectroscopy was used in combination with artificial neural networks to define correlation between predicted and experimental values. For extracts before and after adsorption, the model proved to be suitable for quantitative evaluation since the values of the coefficient of determination were greater than 0.9.*

Keywords: *Lamiaceae, antioxidant activity, microcapsules, emulsions, near-infrared spectroscopy*

Thesis contains: 62 pages, 14 figures, 15 tables, 89 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Davor Valinger, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Maja Benković, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
2. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 25 September 2020

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORETSKI DIO | 2 |
| 2.1. SAMONIKLO BILJE IZ PORODICE <i>Lamiaceae</i> | 2 |
| 2.1.1. Paprena metvica | 2 |
| 2.1.2. Matičnjak | 3 |
| 2.1.3. Kadulja | 4 |
| 2.1.4. Majčina dušica | 6 |
| 2.1.5. Lavanda | 7 |
| 2.2. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U BILJNIM EKSTRAKTIMA | 8 |
| 2.2.1. Fenolni spojevi | 8 |
| 2.2.2. Antioksidacijska uloga fenolnih spojeva | 8 |
| 2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA | 9 |
| 2.3.1. DPPH | 9 |
| 2.3.2. FRAP | 10 |
| 2.3.3. Briggs-Rauscherrova reakcija | 11 |
| 2.4. MIKROINKAPSULACIJA | 11 |
| 2.5. EMULZIJE I EMULGATORI | 13 |
| 2.5.1. Emulzije | 13 |
| 2.5.2. Emulgatori | 14 |
| 2.6. BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA | 15 |
| 2.7. UMJETNE NEURONSKE MREŽE | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI | 17 |
| 3.1.1. Biljni materijali | 17 |
| 3.1.2. Aparatura i pribor | 17 |
| 3.1.3. Kemikalije: | 18 |
| 3.2. METODE | 20 |
| 3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata | 20 |
| 3.2.2. Postupak pripreme mikrokapsula | 20 |
| 3.2.3. Adsorpcija ekstrakata na mikrokapsule | 21 |
| 3.2.4. Otapanje mikrokapsula | 21 |
| 3.2.5. Priprema emulzija | 22 |
| 3.2.6. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata, mikrokapsula i emulzija | 22 |
| 3.2.7. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja | 22 |
| 3.2.8. Mikroskopiranje emulzija | 23 |
| 3.2.9. Kemijske analize | 23 |
| 3.2.9.1. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom</i> | 23 |
| 3.2.9.2. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom</i> | 25 |
| 3.2.9.3. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom</i> | 26 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.9.4. | <i>Određivanje ukupnog udjela polifenola (TPC)</i> | 27 |
| 3.2.10. | Blisko infracrvena spektroskopija | 29 |
| 3.2.11. | Kemometrija i umjetne neuronske mreže | 29 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 30 |
| 4.1. | FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA..... | 31 |
| 4.1.1. | Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata | 31 |
| 4.1.2. | Kemijska svojstva biljnih ekstrakata prije adsorpcije | 32 |
| 4.2. | FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA NAKON ADSORPCIJE..... | 33 |
| 4.2.1. | Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije | 33 |
| 4.2.2. | Kemijska svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije..... | 35 |
| 4.3. | FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA MIKROKAPSULA | 36 |
| 4.3.1. | Fizikalna svojstva mikrokapsula | 36 |
| 4.3.2. | Kemijska svojstva mikrokapsula | 37 |
| 4.4. | EMULZIJE | 38 |
| 4.4.1. | Mikroskopski prikaz unutarnje strukture emulzija | 39 |
| 4.4.2. | Fizikalna svojstva | 40 |
| 4.4.3. | Kemijska svojstva | 42 |
| 4.5. | ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI POMOĆU BRIGGS-RAUSCHER REAKCIJE..... | 45 |
| 4.6. | UMJETNE NEURONSKE MREŽE | 51 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 54 |
| 6. | LITERATURA | 55 |

1. UVOD

U doba kada je ljudska vrsta bila ograničena na usko životno područje, bilo je ključno znati kako u svom okruženju najbolje iskoristiti sve što priroda nudi. Potreba je u najvećoj mjeri primorala rane civilizacije da otkrivaju svijet oko sebe. Tada kao i danas zdravlje je imalo najveću vrijednost, a ljudi su shvatili da samoniklo ljekovito bilje, koje je neometano raslo može pomoći da ga očuvaju. Jedna od najvećih skupina ljekovitog samoniklog bilja je porodica *Lamiaceae*. Ono što je na prvu razlikovalo većinu ovih biljaka od drugih je aromatičnost, a to je vjerojatno i privuklo prve samouke liječnike i terapeute. Tradicionalni principi primjene opstali su do danas, u pogledu narodne medicine i upotrebe kao začina, a u moderno doba sve je više prepoznat značaj i upotreba u prehrambenoj industriji na račun prisutnih bioaktivnih spojeva (Frezza i sur., 2019).

U ovom radu ispitivanja su provedena na vodenim ekstraktima pet različitih samoniklih biljaka iz porodice *Lamiaceae*, koje se na našim prostorima najčešće pripremaju u obliku čajeva, a to su: paprena metvica, matičnjak, kadulja, majčina dušica i lavanda. Od posebnog značaja u provedenom istraživanju bili su polifenoli, bioaktivni spojevi cijenjeni zbog svog antioksidativnog učinka, antimikrobnog i antifungalnog učinka (Milevskaya i sur.,2019).

Cilj je bio ispitati odnose fizikalnih parametara u vodenim biljnim ekstraktima i odrediti koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost. Kako bi se dobio uvid o tome kako potencijalne metode zaštite uzorka, poput mikroinkapsulacije i tvorbe emulzija, utječu na antioksidacijsku aktivnost primijenjene su tri metode (DPPH, FRAP i Briggs-Rauscher reakcija).

Uz to provedena je i blisko-infracrvena spektroskopija, kako bi se prikupili podaci iskorišteni za predviđanje svih izmjerenih vrijednosti, primjenom umjetnih neuronskih mreža. Ideja je bila ispitati koliko se korisnim može potvrditi neinvazivni postupak koji koristi NIR spektroskopija u odnosu na kemijske metode uz različite reagense.

2. TEORETSKI DIO

2.1. SAMONIKLO BILJE IZ PORODICE *Lamiaceae*

Porodica *Lamiaceae* jedna je od najvećih biljnih porodica uopće, a broji više od 240 rodova te preko 7000 vrsta. Ono što je karakteristično za većinu ovih biljaka je aromatičnost, iz čega proizlazi njihova višestoljetna primjena za spravljanje čajeva, korištenje kao začinsko bilje, a u moderno doba i upotreba u kozmetičkoj industriji (Scheen i Albert, 2009).

Hrvatski naziv ove biljne porodice glasi usnače, što potiče od originalnog naziva porodice – *Labiatae*, a ime su dobile zahvaljujući činjenici da cvjetovi obično imaju latice spojene u gornju, odnosno donju usnu. Listovi izbijaju nasuprotno, svaki sljedeći par pod pravim kutom u odnosu na prethodni. Stabljike su zeljaste ili drvenaste, često kvadratne u presjeku, no to može biti svojstveno i za neke druge porodice. Najčešće rastu u obliku manjih grmova, a rjeđe kao povijuše. Mnogi predstavnici usnača su široko rasprostranjeni po svijetu, zahvaljujući ne samo interesantnoj aromatičnosti, već i lakoći kultivacije (Raja, 2012). Gotovo sva klimatska područja pružaju povoljne uvjete za rast ovih biljaka, iako su najoptimalniji uvjeti na mjestima umjerene i tropske klime, od 0 do 2500 metara nadmorske visine, pa je stoga položaj Hrvatske na Mediteranu s razlogom idealan (Frezza i sur., 2019).

Poznato je kako predstavnici porodice *Lamiaceae* u većoj ili manjoj mjeri predstavljaju bogat izvor terpena, flavonoida i fenolnih kiselina (Orhan i sur., 2012), što utječe na njihova povoljna svojstva u službi ljudskog zdravlja te imaju između ostalog antifungalni, antimikrobni i antioksidativni učinak (Milevskaya i sur., 2019).

U ovom radu provedena su istraživanja na 5 uzoraka samoniklih biljaka iz porodice *Lamiaceae*, pripremljenih u obliku vodenih ekstrakata mente, matičnjaka, kadulje, majčine dušice i lavande.

2.1.1. Paprena metvica

Paprena metvica (*Mentha x piperita* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice *Lamiaceae*. U njenom genetskom podrijetlu nalazimo čak četiri tipa metvice, budući da je ona hibrid nastao križanjem klasaste metvice (*Mentha spicata* L., čija je preteča dugolisna metvica – *Mentha longifolia* Huds.) i vodene metvice (*Mentha aquatica* L., čija je preteča *Mentha rotundifolia* Huds.). Može se naći u dvije forme, crna ili bijela paprena metvica, pri čemu u svjetskoj proizvodnji dominira crni varijetet s oko 70 % udjela (Kolac i sur., 2001).

Iako je civilizaciji poznata još od doba prije Krista, značajan porast uzgoja i upotrebe paprene metvice dogodio se krajem 17. stoljeća kada se njena popularnost proširila Europom iz Engleske (Maleš i sur., 2016).

Danas je paprena metvica jedna od najkorištenijih biljaka zbog široke lepeze moguće upotrebe. U kulinarstvu se najviše koristi svježi list kao začín, a jelima dodaje ugodnu aromu i ima svjež, slatkast okus i ostavlja hladan osjećaj u ustima (Taneja i Chandra, 2012). Osušena herba se stoljećima koristi za pripremu čaja, koji ima antiseptična svojstva i čije ispijanje može imati mnoga pozitivna djelovanja. Tako olakšava probavne smetnje kod sindroma iritabilnog crijeva ili zatvora, omogućuje mirniji san i ublažava simptome stresa poput glavobolje. Osim toga pomaže protiv mučnine, menstrualnih i drugih mišićnih grčeva, upale grla, dijareje, prehlade i groznice, a može pomoći i lučenje žuči (Pushpangadan i Tewari, 2006; Taneja i Chandra, 2012). Ostale namjene uglavnom su povezane s eteričnim uljem paprene metvice i njegovim konstituentima. Listovi sadrže u prosjeku 2-4 %, a stabljika i ostali dijelovi biljke 1-2 % eteričnog ulja (Kolak i sur., 2001). Osnovni sastojak ulja je monoterpenski alkohol mentol (oko 50 %), dok su ostali značajniji spojevi menton, 1,8-cineol, mentil acetat, mentofuran, limonen, α -pinen i β -pinen (Pushpangadan i Tewari, 2006). U *in vitro* istraživanjima potvrđeno je kako paprena metvica ubija neke tipove virusa, bakterija i gljivica što upućuje na njena antivirusna, antibakterijska i antifungalna svojstva (Raja, 2012). Eterično ulje i glavni sastojak mentol imaju iznimno raznoliku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Mogu se pronaći u žvakaćim gumama, bombonima, bezalkoholnim i alkoholnim pićima, proizvodima za dentalnu higijenu, parfemima i osvježivačima prostora, šamponima, kremama i gelovima za ublažavanje bolova mišića i mnogim drugim proizvodima (Taneja i Chandra, 2012).

2.1.2. Matičnjak

Matičnjak (*Melissa officinalis* L.), kod nas znan još i pod nazivima melisa i pčelinja ljubica, je dobro poznata mediteranska biljka ugodnog mirisa koji podsjeća na limun. Podrijetlo imena ima u grčkom jeziku gdje riječ melisa znači pčela (Galle Toplak, 2001a), a naši nazivi za matičnjak sugeriraju na to da su cvjetovi ove biljke posebno bili privlačni pčelama odnosno maticama.

Geografsko porijeklo matičnjaka nije do kraja razjašnjeno, iako danas raste po cijelom svijetu. Ipak, neka istraživanja spominju prostore juga Europe, istočnog Sredozemlja, zapadne Azije, Kavkaza i sjevernog Irana kao najvjerojatnije izvore postanka vrste (De Sousa i sur., 2004). U Hrvatskoj obično raste kao samonikla biljka na iskrčenim zemljištima, uz stare zidove i u

vinogradima u submediteranskim kopnenim brdskim (dinarskim) krajevima, a razmnožavanje je moguće putem sjemena ili dijeljenjem (Galle Toplak, 2001a).

Ova biljka raste u visinu od 30 do 125 cm. Stabljika joj je uspravna, razgranata i poput ostalih pripadnika roda *Lamiaceae*, četverbridna. Listovi su nazubljeni, ovalnog oblika, nastavljaju se na peteljku i dugi oko 6, a široki oko 3 cm. Cvjetovi su bijeli, ili rjeđe svijetlo ružičasti i skupljeni su u cvatove na pazušcima gornjih listova. Cijeli nadzemni dio biljke je obično prekriven sitnim dlačicama (Shakeri i sur., 2016).

Više tisuća godina mirisno lišće matičnjaka korišteno je u kulinarstvu kao začim. U medicini je dobro poznata primjena kod tretmana mentalnih bolesti i bolesti središnjeg živčanog sustava, problema sa srcem i krvožilnim sustavom te respiratornim sustavom te kod raznih tumora. Korištena je još i za poboljšanje pamćenja i kao antidepresiv. *Melissa officinalis* ima nekoliko biološki važnih djelovanja zbog kojih pokazuje antioksidativna, hipoglikemična, antimikrobna, antitumorska, antidepresivna, anksiolitična, protuupalna, spazmolitička svojstva (Shakeri i sur., 2016).

U eteričnom ulju najzastupljeniji su oksigenirani monoterpeni – izomeri citrala (geranial i neral), citronelal i geraniol (Mimica-Dukic i sur., 2004). Od fenolnih spojeva značajnije su prisutni derivati hidroksicimetne kiseline, a među njima se ističe ružmarinska kiselina. Pripravci matičnjaka poput čaja ponajprije se upotrebljavaju za ublažavanje anksioznosti, glavobolje, kod nesаницe, kod želučanih i crijevnih tegoba te napuhnutosti. Poboljšavaju tek, osobito kod djece. Kod osoba koje pate od infekcije virusom *Herpes simplex*, vodena iscrpina matičnjaka će imati antivirusni učinak, što se pripisuje u prvom redu ružmarinskoj kiselini (Maleš i sur., 2016).

2.1.3. Kadulja

Kadulja ili žalfija (*Salvia officinalis*) smatra se ljekovitom biljkom s najdužom poviješću uporabe u ljudskoj medicini. Dovoljno o tome govori i porijeklo njenog naziva, budući da latinski *salvare* znači spasiti ili liječiti. Njen značaj bio je dobro prepoznat još u doba egipatskih, rimskih i grčkih civilizacija prije Krista. Domovinom kadulje smatra se Sredozemlje, a danas se komercijalno najviše uzgaja diljem Europe i Sjeverne Amerike (Altindal i Altindal, 2016). Pretpostavlja se kako je rod *Salvia* brojčano najveći od svih rodova u porodici *Lamiaceae*, a broji više od 900 vrsta. Ove vrste su široko rasprostranjene u područjima umjerene, suptropske i tropske klime po starom i novom svijetu, pa tako u Središnjoj i Južnoj Americi raste oko 500 vrsta, u Središnjoj Aziji i na Mediteranu oko 250, te u Istočnoj Aziji još oko 90 različitih vrsta

(Sharifi-Rad i sur., 2018). Iako su tako brojne, velika većina ovih vrsta ima prilično neugodan miris i štetan utjecaj po ljudsko zdravlje, dok se tek nekolicina koristi za prehranu i u medicinske svrhe. Kod nas se kadulja manje uzgaja, a većinom samoniklo raste na suhim kamenitim vapnenačkim tlima u priobalju. Najrasprostranjenija je na jadranskoj obali i otocima (Galle Toplak, 2001b).

Raste u obliku jednogodišnjih ili trajnih grmova visine između 40 i 100 cm. Listovi su ovalni i duguljasti, između 1-4 cm široki i 4-10 cm dugi, s gornje strane sivkasto-zeleni, a s donje strane gusto prekriveni sitnim dlačicama. Ubiru se neposredno prije cvatnje koja traje od svibnja do lipnja. Kao i kod drugih biljaka iz ove porodice, ljubičasti cvjetovi kadulje, obično njih 2-10, nakupljeni su u cvatove (Altindal i Altindal, 2016).

U svakodnevnoj ljudskoj uporabi pronašlo se mnogo različitih primjena za kadulju. Najčešće se koristi u kulinarstvu svježe ili suho lišće kao začinsko bilje, osušeno lišće za pripremu čaja te eterično ulje u industriji parfema i drugim granama kozmetičke industrije (Orhan i sur., 2012).

Iako je sastav aktivnih tvari prilično varijabilan, s obzirom na regiju i uvjete rasta, droga i eterično ulje kadulje može sadržavati brojne monoterpene i njihove derivate poput: α i β -tujona (oko 40-60 %), 1,8-cineola, α -pinena, kamfora, bornil acetata, mircena, limonena, linaloola, borneola i druge. Još valja spomenuti polifenole, dominantnu ružmarinsku kiselinu te flavone i njihove glikozide među kojima se ističe salvigenin (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017; Galle Toplak, 2001b).

Nekada se koristila u borbi protiv kuge, a poznato je da ima umirujući učinak, smanjuje rizik od pojave zloćudnih tumora, suzbija bronhitis, astmu i bolesti srca i krvnih žila, djeluje protiv ciroze jetre i zatajenja bubrega, a uz to može se služiti za ublažavanje bolova i simptoma upaljenog grla (Altindal i Altindal, 2016). Potvrđeno je i kako kadulja može koristiti kao antiperspirant, antiseptik, antispazmolitik, antibiotik, diuretik i karminativ (Cenić-Milošević i sur., 2013). Mnoga istraživanja su pokazala kako primjerice 1,8-cineol i borneol imaju određena antimikrobna, antioksidativna i antifungalna djelovanja. Kao rezultat toga kadulja je uspješno korištena kao prirodni konzervans kako bi se očuvala mikrobiološka ispravnost hrane (Tenore i sur., 2011).

2.1.4. Majčina dušica

Majčina dušica pripada rodu *Thymus* L. u koji ubrajamo otprilike 300-400 vrsta, među kojima su četiri najviše istraživane: *Thymus vulgaris* L. i *Thymus zygis* L., koje smatramo pravim majčinim dušicama, dok su *Thymus serpyllum* L. i *Thymus pulegioides* L. grupirane kao obične ili divlje majčine dušice. Drugi naziv za majčinu dušicu je timijan, a najviše je rasprostranjena na Sredozemlju, osobito na Pirinejskom i Apeninskom poluotoku, jugoistočnoj Europi i sjeveru Afrike (Maksimović i sur., 2008). Postoje određene morfološke i fitokemijske razlike između prave i divlje majčine dušice, radi jednostavnosti će se pod pojmom majčina dušica podrazumijevati vrsta *T. serpyllum* L., čiji je uzorak korišten u ovom radu. Raste u obliku niskog grma, visine do 30 cm, stabljike su modroljubičaste boje, drvenaste uglavnom samo pri dnu. Listovi su brojni i dugi otprilike 1 cm, eliptičnog oblika i blago zavijeni na krajevima. Ljubičasti cvjetovi se nalaze na vrhu stabljike, a cvatnja traje tijekom cijelog ljeta. U prirodi ju možemo pronaći posvuda, na osunčanim travnatim obroncima u nizinama i gorju, krškim sjenokošama, među stijenama i drugdje (Galle Toplak, 2001c).

Majčina dušica ima čestu primjenu u mediteranskoj kuhinji. Kroz povijest su je mnogi narodi koristili u različite svrhe, pa su je tako Egipćani koristili u procesu balzamiranja, Grci dodavali u kupke i palili u religijskim obredima u hramovima, dok su je Rimljani koristili za aromatiziranje sira i alkoholnih pića (Salehi i sur., 2019).

Iz osušene herbe dobije se 0,2–0,6 % eteričnog ulja, čiji su glavni sastojci karvakrol, linalool, β -kariofilen, timol, geraniol, borneol i 1,8-cineol. Točni udjeli ovih spojeva variraju od kemotipa do kemotipa (Stahl-Biskup i Venskutonis, 2004).

Danas majčina dušica ima raznoliku primjenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Sastavni je dio mnogih biljnih preparata, bilo u narodnoj medicini, bilo u farmaceutskoj industriji. Koristi se kao antiseptik, sedativ, diuretik, konzervans, i antispazmotik. Preporuča se kod glavobolja, za ublažavanje kašlja i smirivanje nadražnog grla (Petrović i sur., 2014; Wesołowska i sur., 2015). Eterično ulje i sastojci u ulju zahvaljujući svojim antimikrobnim, protuupalnim, antioksidacijskim i antiseptičkim svojstvima pomažu u jačanju imunskog sustava i borbi protiv infekcija, a također se pokazalo djelotvorno u ublažavanju reumatskih simptoma i slabljenja sluha (Aziz i Rehman, 2008).

2.1.5. Lavanda

Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) raste kao mali, mirisni grm, karakterističan za prostore Mediterana, sjevera Afrike, Arapskog poluotoka, Rusije i jugozapadne Azije (Basch i sur., 2004). U današnje doba središta kultivacije su zemlje južne Europe, Ujedinjeno Kraljevstvo, Sjedinjene Američke Države i Australija. Naziv roda dolazi od latinskog glagola *lavare* što znači prati. Stari Rimljani, koji su zaslužni za njeno ime, dodavali su ekstrakt lavande svojim kupkama, a u iste svrhe koristili su je još i Arapi i Grci, dok je ulje lavande Egipćanima služilo u procesima mumificiranja (Denner, 2009).

Raste u obliku grma visine do 70 cm, a širine do jednog metra. Sama stabljika je kratka, drvenasta i zadebljala te od vrata korijena gusto razgranata. Na četverbridnim granama dužine oko 30 cm nalaze se nasuprotno raspoređeni uski, 3-5 cm dugi, sivo-zelenkasti listići s dlačicama na naličju. Na vrhu stabljike smješteni su plavkasti ili ljubičasti cvjetovi koji tvore klas (Kolac i Šatović, 2003).

Kao droga koriste se cvjetovi lavande, iz kojih se može dobiti do 3 % eteričnog ulja. Poznato je više od stotinu različitih sastojaka u eteričnom ulju lavande, a najčešći su linalil-acetat (17,6 %–53%), linalool (26 %–49 %) i lavandulil-acetat (15,9 %), te manje količine geranil-acetata, geraniola, borneola, kamfora, citronelala i 1,8-cineola. Droga lavande sadrži i značajne količine tanina, čak 12 % (Denner, 2009), a od fenolnih kiselina najzastupljenije su ružmarinska i ferulinska kiselina (Adaszyńska-Skwirzyńska i Dziecioł, 2017).

Primarne aktivne komponente eteričnog ulja su ujedno i najbrojnije – linalil-acetat i linalool. Zajedno djeluju protuupalno, antifungalno, antiseptički, pomažu zacjeljivanje rana te djeluju umirujuće. Čaj od lavande poboljšava probavu, budući da smanjuje nadutost (Denner, 2009). Lavanda je posebno cjenjena u aromaterapiji, pa se preporučuju umirujuće mirisne kupke, a veliku primjenu ima u kozmetičkoj industriji u proizvodnji mirisnih svijeća, sapuna, losiona, parfema, šampona, osvježivača prostora i još mnogo drugih proizvoda (Kolac i Šatović, 2003).

2.2. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U BILJNIM EKSTRAKTIMA

2.2.1. Fenolni spojevi

U posljednjih nekoliko godina istraživači iz područja medicine i bioznanosti, kao i proizvođači hrane i lijekova, postali su sve više zainteresirani za temu fenolnih spojeva. Jedan od glavnih razloga jest što su prepoznata njihova antioksidacijska svojstva, a vezano uz to i njihova sposobnost da zaštite ljudski organizam od bolesti povezanih sa stanjem oksidacijskog stresa (Manach i sur., 2004).

Ukratko, fenolni spojevi su skupina malih organskih molekula koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni metaboliti. U biljaka je njihova osnovna funkcija da zaštite biljku od stanja oksidativnog stresa u kojem se može naći uslijed djelovanja ultraljubičastog zračenja, infekcija, povreda tkiva ili napada patogena (Quideau i sur., 2011). Najčešće ih dijelimo u nekoliko skupina spojeva: pri čemu su najznačajnije fenolne kiseline (derivati hidroksibenzojeve i derivati hidroksicimetne kiseline) i flavonoidi (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i dr.), a tu su još i stilbeni, tanini, lignani, kumarini te druge skupine (Manach i sur., 2004; Tzima i sur., 2018)

Voće, vino i topli napitci poput čaja ili kave najbolji su prirodni izvori fenolnih spojeva, a uz njih mogu se kao dobri izvori razmotriti još i razno povrće, mahunarke te žitarice (Manach i sur., 2004). Upravo u njihovoj dostupnosti leži njihova velika prednost, budući da su već prisutni u svakodnevnoj ljudskoj prehrani i ne treba daleko tražiti kako bi popravili dnevni unos. Tijekom zadnjih desetljeća u brojnim istraživanjima su ispitane zdravstvene dobrobiti ishrane obogaćene fenolnim spojevima. Postoje pozitivne tvrdnje koje upućuju na povezanost unosa namirnica bogatih osobito fenolnim kiselinama i flavonoidima i smanjenja pojave bolesti srca i krvnih žila, raka debelog crijeva, pretilosti, dijabetesa te neurodegenerativnih bolesti (Manach i sur., 2004; Yang i sur., 2000; Rasouli i sur., 2017).

2.2.2. Antioksidacijska uloga fenolnih spojeva

Ono što čini fenolne spojeve tako korisne za naš organizam jest što djeluju kao antioksidansi. To znači da kada su prisutni u organizmu u niskoj koncentraciji u odnosu na supstrat koji sadrži primjerice visoko reaktivne kisikove i dušikove vrste, djeluju kao donori elektrona, te na taj način umanjuju, usporavaju ili potpuno inhibiraju negativne efekte koje oksidacijski stres može imati na normalne funkcije organizma (Huang i sur., 2005).

Prema porijeklu dijelimo ih na endogene i egzogene. Endogeni antioksidansi nastaju u našem organizmu, a to su enzimi poput superoksid-dismutaze, katalaze, glutation-peroksidaze ili neki nenzimatski spojevi (mokraćna kiselina, bilirubin i albumin). Kad endogeni čimbenici ne mogu osigurati dostatnu obranu od oksidacijskog stresa, javlja se potreba za unosom egzogenih antioksidanasa, u obliku dodataka prehrani ili farmaceutskih proizvoda. Egzogeni antioksidansi mogu poticati iz prirodnih izvora (vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoidi, antocijani, neki mineralni spojevi), ali mogu biti i sintetički spojevi, poput butil-hidroksianisola (BHA), butil-hidroksitoluena (BHT), galata i drugih (Pisoschi i Negulescu, 2011).

Zabrinutost zbog mogućih štetnih učinaka po zdravlje najčešće korištenih sintetičkih antioksidansa poput BHA i BHT, preusmjerila je zanimanje znanstvenika ka intenzivnijem istraživanju antioksidanasa iz prirodnih izvora (Hinneburg i sur., 2006).

2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

2.3.1. DPPH

DPPH metoda je jedna od najčešće primjenjivanih metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta (Prior i sur., 2005). Temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, koji nije čest u biološkim sustavima (Moharram i Youssef, 2014), u metanolnoj otopini, pri čemu kao donor elektrona djeluju polifenolni spojevi koji imaju ulogu antioksidanasa te na taj način neutraliziraju DPPH radikal. Metoda je spektrofotometrijska, te se može pratiti promjena boje, iz ljubičaste kada je DPPH radikal nesporen, te nakon reakcije s antioksidansom kada se boja promjeni u žutu. Stoga je promjena apsorbancije linearno ovisna o koncentraciji antioksidanasa u uzorku. Kada je DPPH radikal otopljen u metanolu pokazuje najbolji odziv apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm (Zhong i Shahidi, 2015). Može se koristiti za uzorke otopljene u vodenim i nepolarnim organskim otapalima, te za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa (Prior i sur., 2005). Prednost ove metode je u tome što je DPPH stabilan kromogeni radikal, komercijalno je dostupan pa ga nije potrebno pripremati prije analize (Zhong i Shahidi, 2015). Svoju stabilnost duguje nevezanom elektronu delokaliziranom u okviru cijele molekule, koji ne dimerizira, što je slučaj kod brojnih drugih radikala (Pisoschi i Negulescu, 2011). Smatra se točnom, jednostavnom i ekonomičnom metodom za procjenu antioksidativnog kapaciteta (Kedare i Singh, 2011). Rezultati su visoko reproducibilni i mogu se uspoređivati s drugim metodama. DPPH test, iako jednostavan i

robustan, zbog svoje osjetljivosti može zahtijevati da se posveti pažnja na brojne čimbenike, kao što su vrsta i količina korištenog otapala, prisutnost i koncentracija vodikovog i metalnog iona te svježina DPPH reagensa. Kao jedno od većih ograničenja ove metode smatra se to što postoji preklapanje spektara spojeva koji apsorbiraju u istom rasponu valne duljine kao DPPH. Na primjer, antocijani imaju snažnu apsorpciju u istom rasponu valnih duljina (500–550 nm) kao i DPPH što može dovesti do smetnji u rezultatima i njihovoj interpretaciji (Zhong i Shahidi, 2015).

2.3.2. FRAP

FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda temelji se na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) od strane antioksidansa. Prijelazom iz Fe^{3+} oblika kompleksa u Fe^{2+} uslijed redukcije od strane antioksidanasa dolazi do promjene boje otopine u modru (Antolovich i sur., 2002). Rezultati se dobiju mjerenjem porasta apsorbancije pri 593 nm i mogu se izraziti u mikromolarnim Fe^{2+} ekvivalentima ili u odnosu na antioksidans koji se koristi kao standard, primjerice Trolox (Pisoschi i Negulescu, 2011). Za razliku od drugih metoda temeljenih na prijenosu elektrona, FRAP analiza se provodi u kiselim pH uvjetima (pH 3,6) kako bi se održala topljivost željeza i što je još važnije, potakao prijenos elektrona. To će dovesti do povećanja redoks potencijala (Hegerman i sur., 1998). Iako originalni FRAP test koristi TPTZ kao ligand koji veže željezo, razvijeni su i modificirani postupci koji koriste alternativne ligande, kao što je ferozin (Molina-Diaz i sur., 1998), ili u novije vrijeme, kalijev ferocijanid (Zhong i Shahidi, 2015).

Metoda je jednostavna, brza i ekonomična, ne zahtjeva sofisticiranu opremu, a opisani su i ručni i automatizirani postupci. Postoje, međutim, tvrdnje kako rezultat ne predstavlja nužno antioksidacijsku aktivnost. Umjesto toga pruža vrlo korisne podatke o ukupnoj koncentraciji antioksidanasa, bez potrebe za mjerenjem i zbrajanjem koncentracija svih prisutnih antioksidanasa. Metoda se izvorno primjenjivala na plazmi (Benzie i Strain, 1999), ali je proširena i na druge biološke tekućine, hranu, biljne ekstrakte, sokove itd (Antolovich i sur., 2002).

2.3.3. Briggs-Rauscherova reakcija

Pored gore spomenutih, u svrhu određivanja antioksidacijske aktivnosti u posljednje vrijeme sve se češće proučava i Briggs-Rauscherova (BR) oscilirajuća reakcija. Ova metoda se koristi isključivo u slučaju antioksidanasa topivih u vodi (Cervellati i sur., 2001; Höner i Cervellati, 2002), pa se upotrebljava primjerice za praćenje antioksidacijske aktivnosti voća, povrća, vina, čajeva ili sokova. Iako detaljan mehanizam ove vrlo složene reakcije i dalje nije poznat, predstavljeno je nekoliko modela (Furrow i Noyes, 1982; DeKepper i Epstein, 1982; Vukojevic i sur., 1996) koji sa zadovoljavajućom točnošću opisuju odvijanja kroz pojedine stupnjeve reakcije.

Ova metoda temelji se na inhibicijskim učincima antioksidansa na oscilacije Briggs-Rauscherove reakcijske smjese. Tri su glavne karakteristike BR reakcije. Prvi je da je to oscilirajući kemijski sustav. Miješanjem vodikovog peroksida, malonske kiseline, manganovog (II) sulfata kao katalizatora, kalijevog jodata, sumporne kiseline i škroba kao indikatora, dobije se kemijski nestabilan sustav koji prolazi kroz brojne reakcije, a sve se odvijaju istovremeno, dok konačno sustav ne dostigne ustaljeno stanje. Druga karakteristika je da postoji kvantitativni dokaz kemijskih reakcija koje se odvijaju, u obliku promjene električnog potencijala. Posljednja bitna karakteristika, možda i najimpresivnija, jest da postoji jasna, vizualna potvrda odvijanja reakcije. Kada se različite kemikalije miješaju u otopini, rezultat je atraktivan niz cikličkih promjena boje iz prozirne u jantarno žutu do tamno plave (Gajdoš Kljusurić i sur., 2005). Kada se aktivnoj oscilirajućoj reakcijskoj smjesi doda uzorak koji sadrži antioksidanse dolazi do trenutne inhibicije oscilacija, budući da se oni vežu i tako uklanjaju slobodne peroksidne radikale, a vrijeme inhibicije do ponovnog uspostavljanja oscilacija je linearno ovisno o koncentraciji dodanog antioksidansa (Cervellati i sur., 2001).

2.4. MIKROINKAPSULACIJA

Jedan od najčešćih načina konzumacije ljekovitog bilja je priprema vodenih ekstrakata poput infuzija ili dekokcija iz cvijeća, lišća i korijenja. Budući da je većina vrijednih fenolnih spojeva hidrofilne prirode, njihova je izravna upotreba u namirnicama složenog sastava ograničena. Mogući način rješavanja ovog problema je primjena tehnologije mikroinkapsulacije (Belščak-Cvitanović i sur., 2011).

Mikroinkapsulacija je proces okruživanja ili omotavanja male količine jedne tvari unutar neke druge tvari čime nastaju kapsule u rasponu veličine nižim od jednog mikrona do nekoliko stotina mikrona (Jyothi i sur., 2012).

S obzirom na njihov oblik i konstrukciju, kapsule možemo podijeliti u dvije skupine: mikrokapsule i mikrosfere. Mikrokapsule se sastoje od unutarnje jezgre koja sadrži aktivnu tvar, koja je prekrivena vanjskim polimernim slojem kojeg zovemo membrana. S druge strane, mikrosfere su matriks sustavi u kojima je jezgra jednolika u polimernoj mreži. Mikrosfere mogu biti homogene ili heterogene, ovisno o tome sadrži li jezgra otopljene tvari ili suspendirane čestice (Silva i sur., 2014).

Vrlo važna stvar kod procesa mikroinkapsulacije je izbor samog materijala kapsule. Karakteristike kojima mora udovoljavati materijal koji obavlja aktivnu tvar su nepropusnost, niska higroskopnost, fleksibilnost i čvrstoća te kemijska inertnost prema aktivnom sastojku (Bansode i sur., 2010). Među brojnim tvarima koje se koriste za inkapsulaciju ciljane tvari, prirodna rješenja kao što je natrijev alginat privukla su veliko zanimanje zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti (Xu i sur., 2007). Alginat je negativno nabijen biopolimer dobiven primarno iz smeđih morskih algi (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera*) i nekih vrsta bakterija poput *Pseudomonas* i *Azotobacter*. Sastoji se od α -L-glukuronske i β -D-manuronske kiseline međusobno povezanih α -1,4-glikozidnim vezama (Goh i sur., 2012). U prisustvu dvovalentnih metalnih iona, najčešće kalcijevih kationa, alginat pokazuje sposobnost geliranja, tvoreći sitne čvrste kuglice veličine 200-5000 mikrona (Velings i Mestdagh, 1995). Najvažnije odlike alginata su njegova razgradivost, netoksičnost, termostabilnost i niska cijena, što ga čini jednim od najčešće korištenih polimera za mikroinkapsulaciju i imobilizaciju (Zhang i sur., 2013).

U prehrambenoj industriji mikroinkapsulacija se primjenjuje iz nekoliko razloga:

- da bi se smanjila reaktivnost jezgre u odnosu na uvjete koji vladaju vanjskom okruženju (npr. svjetlost, kisik i voda),
- da bi se smanjila brzina prijenosa tvari iz jezgre prema vanjskom okruženju,
- da bi tekućinu preveli u čvrsti oblik,
- za kontrolirano ispuštanje tvari iz jezgre u sustav u pravom trenutku,
- za maskiranje okusa,
- da bi se postigla optimalna i jednolika disperzija vrlo male količine aktivne tvari u složenom sustavu (Shahidi i Han, 1993).

Sve je izraženije zanimanje vezano za unos prirodnih bioaktivnih spojeva putem hrane, ali problemi povezani s osjetljivošću tih spojeva na štetne vanjske učinke ili štetne uvjete prerade hrane te njihova kemijska nestabilnost predstavljaju poteškoće za njihovu ugradnju u svakodnevne namirnice. Mikroinkapsulacija, međutim, ima značajan potencijal, jer bi se na taj način moglo omogućiti obogaćivanje raznih prehrambenih proizvoda s prirodnim antioksidansima i drugim bioaktivnim spojevima (Belščak-Cvitanović i sur., 2011).

2.5. EMULZIJE I EMULGATORI

2.5.1. Emulzije

Emulzije su disperzni sustavi koji se sastoje od dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju. Jedna tekućina je u obliku kapljica (disperzna faza) raspršena unutar druge tekućine (kontinuirana faza). Najčešće dvije faze koje se koriste u tvorbi emulzija su voda i ulje (Tadros, 2016). Na temelju raspodjele ovih dviju faza razlikujemo i podjelu prema tipu emulzije. Tako emulzije mogu biti tipa ulje u vodi (U/V), u kojoj su kapljice ulja dispergirane u vodenoj fazi, a primjeri emulzija ovog tipa su majoneza, mlijeko, vrhnje, juhe i umaci. U drugom tipu su kapljice vode dispergirane u uljnoj fazi (emulzija voda u ulju – V/U), a takvi su prehrambeni proizvodi poput margarina i maslaca. Ova dva tipa su najčešći, no postoje i složeni sustavi poput emulzija tipa voda u ulju u vodi ($V_1/U/V_2$). Ovakav višefazni sustav sastoji se od emulzije voda u ulju (V_1/U) dispergirane unutar druge kontinuirane vodene faze (V_2). Također moguć je i obratan slučaj, s jednom vodenom i dvije uljne faze (Tatar i sur., 2017). Takvi složeni sustavi imaju neke prednosti pred tipičnim dvofaznim emulzijama, primjerice sposobnost da obaviju i zaštite osjetljive tvari, omogućće njihovo kontrolirano otpuštanje iz unutarnje u vanjsku fazu te da izoliraju jednu inkorporiranu tvar od druge. (Bou i sur., 2014; Lobato-Calleros i sur., 2006).

Postupak dobivanja emulzije naziva se homogenizacija, a postiže se primjenom dovoljne količine energije na sustav ulje – voda kako bi nastale manje kapljice. Općenito, što je manja veličina koju treba postići, to je potreban veći unos energije (McClements i Li, 2010). Prema tome, s obzirom na veličinu raspršenih kapljica jedne faze u drugoj razlikujemo:

- Makroemulzije – raspon veličine čestica od 0,1 μm – 5 μm
- Mikroemulzije – raspon veličine čestica od 5 nm – 50 nm
- Nanoemulzije – raspon veličina od 20 nm – 200 nm (Tadros, 2016).

U slučaju makroemulzije, kapljice veličine nekoliko mikrometara mogu se jednostavno formirati uz dovoljno brzo miješanje. Da bi dodatno smanjili veličinu kapljice do submikronskog raspona, potreban je veći unos energije, a za to se mogu primijeniti razni mehanizmi za razdvajanje, kakvi su rotor-stator, visokotlačni, membranski i ultrazvučni sustavi (Schultz i sur., 2004).

Sposobnost sustava da održi dispergiranoost jedne faze unutar druge ovisi o stabilnosti emulzije. Sve su emulzije po prirodi nestabilne, a dvije će se faze s vremenom spontano odvojiti. Nestabilnost emulzija može rezultirati nekim nepoželjnim procesima u hrani, uključujući odvajanje ulja i taloženje, što smanjuje kvalitetu proizvoda i skraćuje rok trajanja. Stabilnost emulzije odnosi se na sposobnost emulzija da odolijevaju promjenama svojih fizikalno-kemijskih svojstava tijekom vremena. Mehanizmi koji dovode do nestabilnosti emulzije uključuju gravitacijsko odvajanje (sedimentacija), flokulaciju, koalescenciju, Ostwaldovo zrenje i faznu inverziju. Na stabilnost emulzija u najvećoj mjeri utječu svojstva samih faza i uvjeti obrade pri tvorbi emulzije (McClements, 2015).

2.5.2. Emulgatori

Budući da su prehrambeni sustavi kompleksni i sastavljeni od različitih komponenti koje se često dobro ne miješaju međusobno, mogu se stabilizirati odgovarajućim emulgatorima (Hu i sur., 2017).

Emulgatori su male površinski aktivne tvari (surfaktanti) koje smanjuju površinsku napetost između različitih faza. Građeni su od hidrofilne skupine (glava) na jednom kraju, koja ima visoki afinitet za vodu i lipofilne skupine (repa) na drugom kraju, koja ima visok afinitet prema ulju. (Lovrić, 2003). Mogu biti kationski, anionski i amfoterni. Emulgatore za određene smjese biramo prema HLB broju (Hydrophile-Lyphophile Balance) koji opisuje topljivost u fazama emulzije. Emulgatori s vrijednostima HLB-a u rasponu od 3-6 prikladni su za izradu emulzija tipa voda u ulju, oni s vrijednostima HLB-a u rasponu od 10-18 za izradu emulzija tipa ulje u vodi, dok emulgatori s vrijednosti HLB broja između 7-9 ne pokazuju izrazitu preferenciju prema ijednom tipu emulzije.

Sve veći dio naše svakodnevne prehrane čini komercijalno dostupna prerađena hrana, za što su potrebni emulgatori kako bi olakšali procesiranje i osigurali gotove proizvode ujednačene kvalitete. U prerađeni hrane tri glavne funkcije emulgatora su:

- 1) Poboljšavanje formiranja emulzije i osiguravanje njene stabilnosti, kontrolirajući stanja disperzije i aglomeracije kapljica ulja
- 2) Produljenje roka trajanja
- 3) Kontrola i izmjena teksture i morfologije proizvoda na bazi masti utjecajem na veličinu i distribuciju kapljica ulja (Chen, 2015).

2.6. BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Blisko-infracrvena (NIR, eng. Near infrared) spektroskopija je tehnika sa širokom primjenom za kvantitativne i kvalitativne analize. Često se koristi u prehrambenoj industriji, ali i drugim granama industrije, poput farmaceutske industrije, biomedicine, agronomije i drugdje. Koristi se za mjerenje apsorpcije elektromagnetske energije nekog uzorka u rasponu valnih duljina od 800 do 2500 nm, odnosno od 12 500 do 4000 cm^{-1} (Ozaki i sur., 2017). Vrpce koje čine NIR spektar rezultat su rastezanja O—H, C—H, i N—H veza. (Kradjel, 1991). Budući da uzorci karakteristični za prehrambenu industriju uglavnom sadrže ugljikohidrate, bjelančevine i lipide, a kojima su osnovni gradivni atomi ugljik, vodik, kisik i dušik, to ih čini povoljnima za promatranje pomoću NIR spektroskopije (Kradjel, 1991; Ozaki sur., 2017). Znajući da NIR spektroskopija omogućuje izrazito brzu (u trajanju od svega nekoliko sekundi), nedestruktivnu, *in situ* analizu, može se koristiti ukoliko je potrebno provesti snimanje u realnom vremenu uz smanjenu mogućnost kontaminacije odnosno uništavanja uzorka (Findlay i Bugay, 1998). Uz to treba napomenuti i kako pri ovakvoj analizi nije potrebna uporaba kemijskih reagensa čime se u duhu ideje zelene kemije smanjuje količina kemijskog otpada, a priprema samog uzorka je jednostavna i često minimalna (Ozaki i sur., 2017). S druge strane, vrpce u NIR-spektrima nešto su manje informativne u usporedbi s nekim drugim spektroskopskim metodama, jer u mnogim slučajevima može doći do njihova preklapanja. Iz tog razloga često je dobivene podatke potrebno obraditi nekom od multivarijantnih metoda analize (Jednačak i Novak, 2013).

2.7. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Umjetne neuronske mreže predstavljaju jedan oblik moderne tehnologije umjetne inteligencije koja se koristi kako bi se što uspješnije simulirala mislilačka funkcija ljudskog mozga. Kao i u stvarnom biološkom mozgu, tako se i ovdje osnovne gradivne jedinice nazivaju neuroni. Neuroni su organizirani u slojevima koji čine tzv. mrežnu "arhitekturu". Na početku arhitekture

se nalazi ulazni sloj, a svaki od njegovih neurona prima ulazne signale iz nekog skupa podataka, ili uživo čita podatke koje bilježe senzori. Završni sloj se zove izlazni sloj, a njegova uloga je da procesira ulaznu informaciju iz prethodnog sloja i prikazuje ju kao izlazni odgovor. Između početnog i završnog sloja nalazi se jedan ili više skrivenih slojeva neurona koji funkcioniraju na principu "crne kutije" (Huang i sur., 2007) Kao i ljudski mozak kroz svoj životni vijek tako se i mreže umjetnih neurona razvijaju i poboljšavaju kroz procesiranje informacija. Taj proces uključuje učenje, testiranje i validaciju.

Često se umjetne neuronske mreže koriste za interpretaciju složenih podataka iz spektara (najčešće u kombinaciji s NIR spektroskopijom) što uključuje kako kvantitativnu analizu, tako i kvalitativnu analizu (Long i sur., 1990; Yang i Griffiths, 1999). Pritom se kao ulazna informacija koriste izmjereni podaci cijelog spektra ili sažeti spektralni podaci (kakvi se mogu dobiti primjenom kemometrijskih metoda poput analize glavnih komponenti – PCA), a kao izlazna informacija primjerice koncentracija analita ili traženo fizikalno ili kemijsko svojstvo.

Umjetne neuronske mreže korištene su tijekom zadnjih nekoliko desetljeća u gotovo svim područjima znanosti o hrani i prehrambenoj tehnologiji, iako su sami počeci bili relativno spori. Umjetne neuronske mreže se današnje vrijeme koriste za analizu sigurnosti i kvalitete hrane, interpretiranje spektara te predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava pri proizvodnji hrane (Huang i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijali

Biljni ekstrakti na kojima su u ovom diplomskom radu vršena ispitivanja pripremljeni su iz pet različitih vrsta osušenih biljaka iz porodice *Lamiaceae*:

- Lišće matičnjaka (*Melissa officinalis*) – zemlja podrijetla: Srbija
- Lišće mente (*Mentha x piperita*) – zemlja podrijetla: Srbija
- Zelen majčine dušice (*Thymus serpyllum*) – zemlja podrijetla: Albanija
- List kadulje (*Salvia officinalis*) – zemlja podrijetla: Hrvatska
- Cvjetovi lavande (*Lavandula angustifolia*) – zemlja podrijetla: Kina.

Dobavljač svih uzoraka bila je tvrtka Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska).

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Centrifuga (Hettich, Kirchleingern, Njemačka)
- Konduktometar (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (Inkolab ST605, Zagreb, Hrvatska)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- Vorteks (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija)
- pH-metar (Jenco 601A, Dallas, SAD)
- Mikroskop i kamera (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska)
- NIR spektrometar NIR-128-1.7-USB/6.25/50µm (Control Development, SAD) i računalo opremljeno s pripadajućim softverom Spec32.
- softver Statistica 13.3 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD)

Pribor:

- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 5 i 10 mL
- Mikropipete volumena 100 μL , 1000 μL
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Falcon kivete
- Eppendorf kivete
- Odmjerne tikvice volumena 100 mL
- Laboratorijske čaše
- Menzure
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Filter papir
- Aluminijske posudice za sušenje
- Šprice s iglom
- Cjedilo
- Špatule
- Štoperica

3.1.3. Kemikalije:

- Destilirana voda
- PEG (polietilen glikol) 1500 Acros Organics, Njemačka
- PEG (polietilen glikol) 6000 Acros Organics, Belgija
- PEG (polietilen glikol) 20000 SigmaAldrich, Njemačka
- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska)
- Natrijev alginat ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) (Fisherscientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrijev citrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (T.T.T. d.o.o. Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Kalcijev klorid bezvodni (CaCl_2) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (CH_3OH) (J.T. Naker, Hampton, New Hampshire, Sjedinjene Američke Države)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Klorovodična kiselina 37 % (HCl) (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Octena kiselina 99,5 % (CH_3COOH) (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezo(III)-klorid-heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Galna kiselina 98 % ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$) (Across Organics, Geel, Belgija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox ili TE, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Slovenija)
- kalijev jodat (KIO_3) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- malonska kiselina ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- manganov sulfat monohidrat ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- sumporna kiselina (H_2SO_4) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- škrob ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- vodikov peroksid (H_2O_2) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

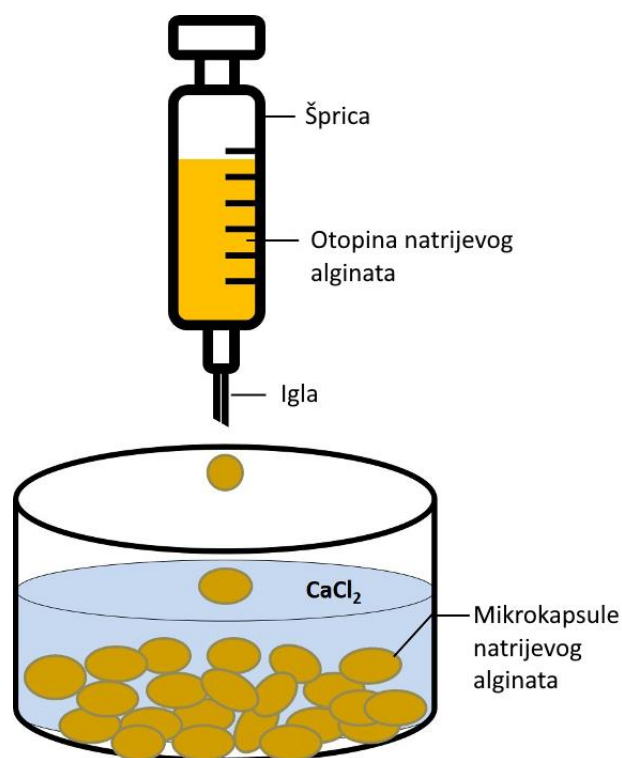
3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata

U staklenu laboratorijsku čašu volumena od 1 litre odvagano je 20 g uzorka usitnjenog osušenog bilja (lišće, zelen ili cvjetovi) te preliveno s 1000 mL destilirane vode zagrijane na temperaturu od 80 °C. Potom je ekstrakcijska smjesa termostatorirana pri istoj temperaturi na magnetnoj miješalici s grijačem (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri 250 okretaja u minuti tijekom 30 minuta. Nakon isteka 30 minuta, uzorak je profiltriran, kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krutog biljnog materijala.

Svi pripremljeni biljni ekstrakti nakon toga korišteni su za određivanje pH vrijednosti, električne vodljivosti, udjela ukupnih otopljenih tvari (TDS), koncentracije ukupnih fenola, antioksidacijskog kapaciteta DPPH i FRAP metodom te primjenom Briggs-Rauscherove oscilirajuće reakcije te podvrgnuti blisko-infracrvenoj spektroskopiji (NIR). Preostali dio tekućeg ekstrakta korišten je za mikroinkapsulaciju i tvorbu emulzija sa suncokretovim uljem uz pomoć emulgatora PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000, a na ovim uzorcima provedene su iste fizikalno-kemijske metode analize kao i za izvorne biljne ekstrakte.

3.2.2. Postupak pripreme mikrokapsula

Pripremljena je 3 % (w/w) otopina natrijeva alginata u destiliranoj vodi te potom homogenizira na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri 300 okretaja u minuti (okr min^{-1}). Za prihvata mikrokapsula pripremljena je i 2 % (w/w) otopina kalcijeva klorida koja omogućuje geliranje alginata. Šprica s iglom se napuni otopinom alginata. Pažljivim i ujednačenim stiskanjem šprice, otopina alginata se kap po kap prenosi u otopinu kalcijeva klorida (CaCl_2). Vizualni prikaz postupka vidljiv je na ilustraciji (slika 1). Nakon što je sav alginat istisnut iz šprice u otopinu, mikrokapsule se 30 minuta ostave u prihvatnoj otopini kalcijevog klorida kako bi se stabilizirale. Zatim se ocijede, osuše na zraku i pohrane u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal).



Slika 1. Ilustrirani prikaz formiranja mikrokapsula alginata (Gao i sur., 2016)

3.2.3. Adsorpcija ekstrakata na mikrokapsule

Nakon što su se kuglice dobro posušile, izdvoji se 30 g mikrokapsula, doda u 450 mL ekstrakta te se ostavi da odstoji pokriveno preko noći na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri 250 okr min^{-1} . Nakon toga, kuglice se ocijede, dobro obrišu papirnatim ubrusom i stave u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal). Ekstrakt zaostao nakon adsorpcije pohranjen je za daljnje analize.

3.2.4. Otapanje mikrokapsula

Kako bi se oslobodio ekstrakt kojeg su na sebe vezale, izdvojeno je 2 g mikrokapsula i otopljeno u 5 mL natrijevog citrata u Falcon kiveti uz miješanje na vorteksu (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija) tijekom 15 minuta. Potom je smjesa otopljenih mikrokapsula centrifugirana (Hettich, Kirchlengern, Njemačka) pri $6000 \text{ okr min}^{-1}$ kako bi se odvojio supernatant koji je dalje korišten za analize.

3.2.5. Priprema emulzija

Emulzije vodenih biljnih ekstrakata i suncokretovog ulja pripremane su uz emulgatore PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000. Za početak su ova 3 tipa emulgatora (tablica 1) otopljeni u 50 ml biljnih ekstrakata tijekom 10 minuta na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri konstantnom miješanju od 500 okr min^{-1} na temelju prethodno dobivenih optimalnih uvjeta za uzorke paprene metvice (nisu prikazani u ovom radu):

Tablica 1. Vodene otopine emulgatora u biljnom ekstraktu

| Korišteni emulgator | PEG 1500 | PEG 6000 | PEG 20 000 |
|---|----------|----------|------------|
| Udio emulgatora u biljnom ekstraktu [w/w] | 2,1 % | 3,52 % | 2,04 % |

Same emulzije ulja u vodenim ekstraktima su potom priređene u Falcon epruветama volumena 15 mL. U slučaju emulzija s biljnim ekstraktima uz PEG 1500 i PEG 6000 udio suncokretovog ulja iznosio je 35 %, a za emulzije biljnih ekstrakata uz PEG 20 000 udio ulja je iznosio 26 %. Na kraju su emulzije dobivene homogenizacijom pri 16 524 okr min^{-1} koristeći homogenizator (TH-02, Omni international, SAD) kroz 4 minute.

3.2.6. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata, mikrokapsula i emulzija

Vodljivost, TDS i pH vrijednost

Nakon što su svi uzorci pripremljeni i ohlađeni izmjerena je vodljivost i udio ukupnih otopljenih tvari (engl. Total Dissolved Solids, TDS) konduktometrijski (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) te pH vrijednost (Jenco 601A, Dallas, SAD) uranjanjem sonde u tekući ekstrakt.

3.2.7. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem odvažuje se po 3 grama uzorka. Posudice s uzorkom se prenese u sušionik s automatskom regulacijom temperature (Inkolab ST605, Zagreb, Hrvatska) gdje se drže otvorene 3 sata pri 105 °C. Kada je sušenje završeno, posudice

se zatvore u sušioniku, prenesu u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal) te hlade na sobnoj temperaturi. Vaganjem na analitičkoj vagi (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka) zabilježi se konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

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

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

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

Pri čemu je:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

3.2.8. Mikroskopiranje emulzija

Kako bi se dobio bolji uvid u dispergiranost, uzorci su snimljeni korištenjem mikroskopa i kamere (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska).

3.2.9. Kemijske analize

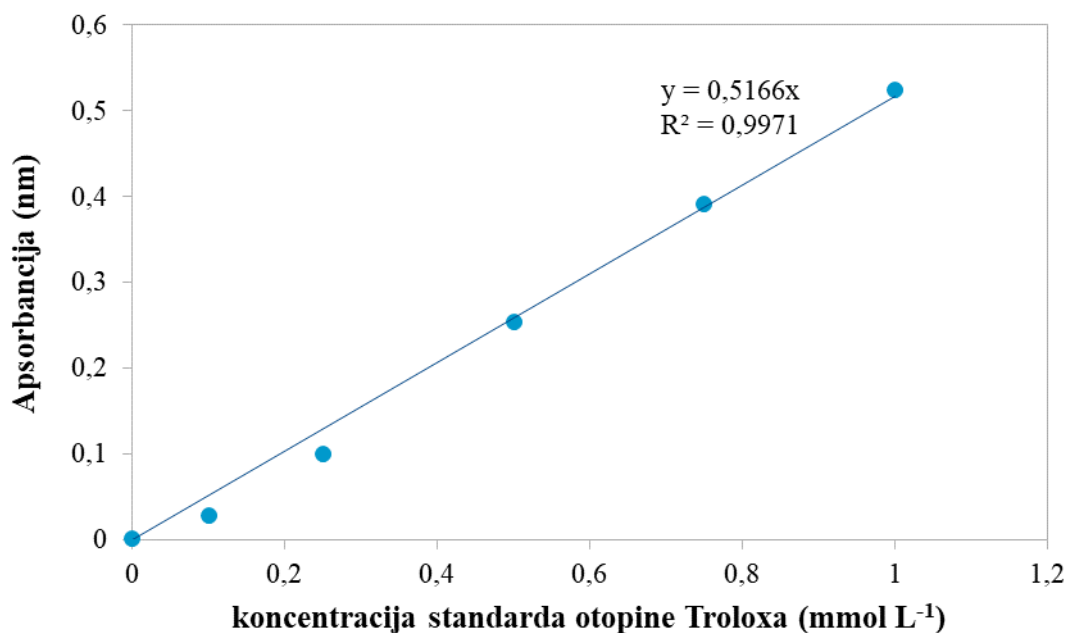
3.2.9.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost se može odrediti na više načina, od kojih je prva korištena u ovom radu DPPH metoda. Princip je zasnovan na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH \cdot) izlaganjem uzorku koji sadrži antioksidanse. Otopina DPPH \cdot u metanolu ima intenzivnu ljubičastu boju koja prelazi u žutu u prisustvu elektron donora, u ovom slučaju antioksidansa. Stupanj promjene boje odgovara antioksidativnoj moći komponenata u uzorku i može se pratiti spektrofotometrijski.

Pripremi se otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH \cdot) u metanolu koncentracije 0,094 mmol L $^{-1}$. U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μ L uzorka i doda 3,9 mL (0,094 mmol L $^{-1}$) otopine DPPH \cdot te dobro homogenizira. Slijepa proba se pripremi na isti način, no umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Za odvijanje reakcije nužno je pohraniti

pripremljene uzorke na mračno mjesto se tijekom 30 minuta. Po završetku reakcije se pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska), mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Kao standard za preračunavanje dobivenih rezultata, ova metoda koristi analog vitamina E topljiv u vodi – Trolox. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a konstruira se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije, pomoću baždarnog dijagrama (slika 2) se očitaju ekvivalentne koncentracije (mmol L^{-1}) te se preračunaju i izražavaju kao mmol g^{-1} ekvivalenata Troloxa.



Slika 2. Baždarni dijagram za Trolox

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,5166x \quad [3]$$

Gdje je:

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

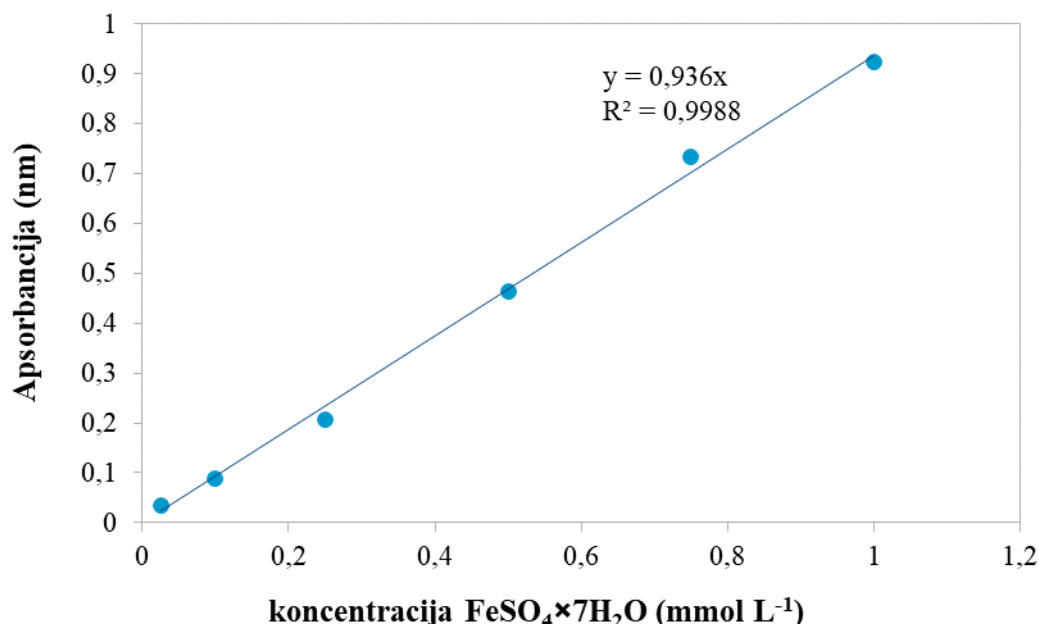
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije (nm)

3.2.9.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda temeljena je na redukciji željeza iz Fe^{3+} oblika unutar kompleksa s 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazinom u Fe^{2+} oblik. Donori elektrona u ovom slučaju su antioksidansi, a redukcija se očituje promjenom boje iz žute u intenzivnu plavu. Što je veća redukcijska sposobnost antioksidansa prisutnih u uzorku, to će intenzitet plavog obojenja biti jače izražen.

Za tvorbu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije 300 mmol L^{-1} , otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) koncentracije 10 mmol L^{-1} te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) koncentracije 20 mmol L^{-1} . U čaši se pomiješa 25 mL acetatnog pufera s 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ tako da omjer dodanih otopina bude 10:1:1. Za postupak mjerenja, u kiveti se pomiješa 50 μL uzorka i 950 μL FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm (UV-VIS spektrofotometar - Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska). Slijepa proba priprema se na isti način, s jednom iznimkom, da se umjesto uzorka doda 50 μL vode i pomiješa s jednakom količinom FRAP reagensa.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije, pomoću baždarnog se pravca (slika 3) očitaju se ekvivalentne koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.



Slika 3. Baždarni dijagram za $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,936x \quad [4]$$

Gdje je:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije (nm)

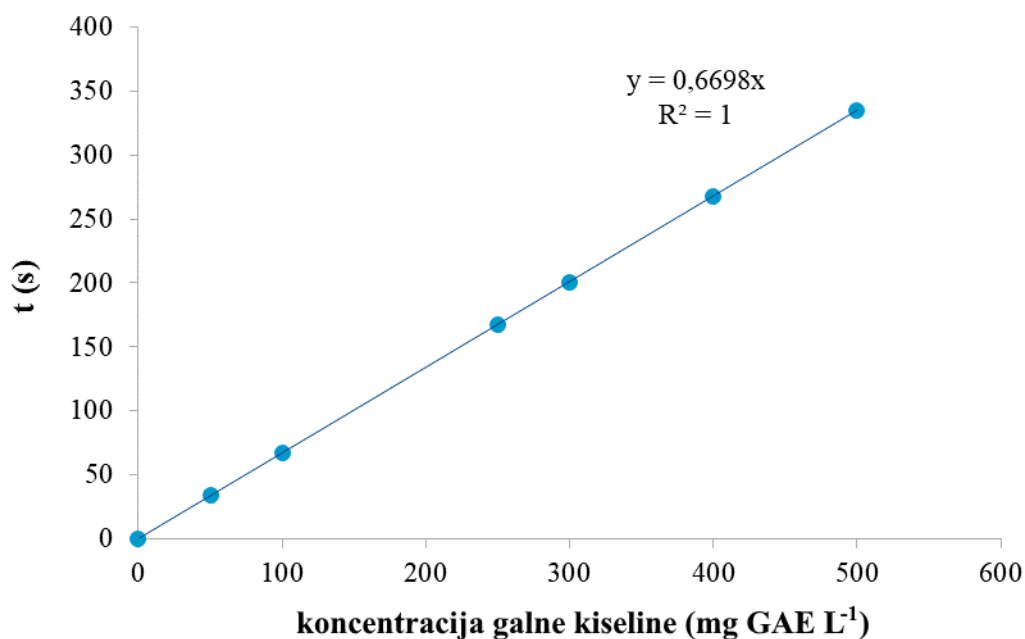
3.2.9.3. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom*

Metoda se temelji na određivanju vremena inhibicije Briggs-Rauscher oscilirajuće reakcije dodatkom tvari koja ima antioksidacijska svojstva u reakcijsku smjesu. Vrijeme inhibicije Briggs-Rauscher oscilirajuće reakcije proporcionalno je količini i svojstvima tvari s antioksidacijskim djelovanjem (Gajdoš Kljusurić i sur., 2005).

Potrebno je pripremiti tri otopine (A, B i C). Otopina A mora biti svježe pripremljena, a priprema se razrjeđenjem 30 %-tnog vodikovog peroksida destiliranom vodom u omjeru 1:1. Otopina B priprema se tako da se odvaži 4,3 g kalijevog jodata (KIO_3) i prenese u tikvicu od 100 mL te se doda 50 mL destilirane vode i dobro izmiješa. Zatim se doda 0,45 mL koncentrirane sulfatne kiseline (H_2SO_4) i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina C priprema se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL stavi 1,5 g malonske kiseline, 0,4 g manganovog sulfata ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) te se doda 15 mL prethodno pripremljene otopine škroba i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina škroba priprema se kuhanjem 0,1 g škroba u 100 mL vruće destilirane vode 5 min.

Briggs-Rauscher reakcije provode se u reakcijskoj smjesi pripremljenoj miješanjem otopina A, B i C. U čašu volumena 50 mL stavi se 5 mL otopine A i 5 mL otopine B. Smjesa se dobro promiješa te se doda 5 mL otopine C i nastavi miješati na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija). Dolazi do promjene boje reakcijske smjese iz bezbojne u žutu pa u plavu i tako ciklički. Nakon treće pojave plavog obojenja u reakcijsku smjesu dodaje se 50 μL uzorka te se pomoću potenciometrijske elektrode i uz pomoć računala prati vrijeme inhibicije, odnosno vrijeme do ponovne pojave plavog obojenja (ponovnih oscilacija).

Antioksidacijski potencijal računa se na osnovu baždarnog pravca galne kiseline (slika 4) koja se dodaje u reakcijsku smjesu umjesto uzorka ($0\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 4. Baždarni dijagram galne kiseline za Briggs-Rauscherovu reakciju

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,6698x \quad [5]$$

Gdje je:

x – ekvivalent galne kiseline mg GAE L⁻¹

y – vrijeme inhibicije (s)

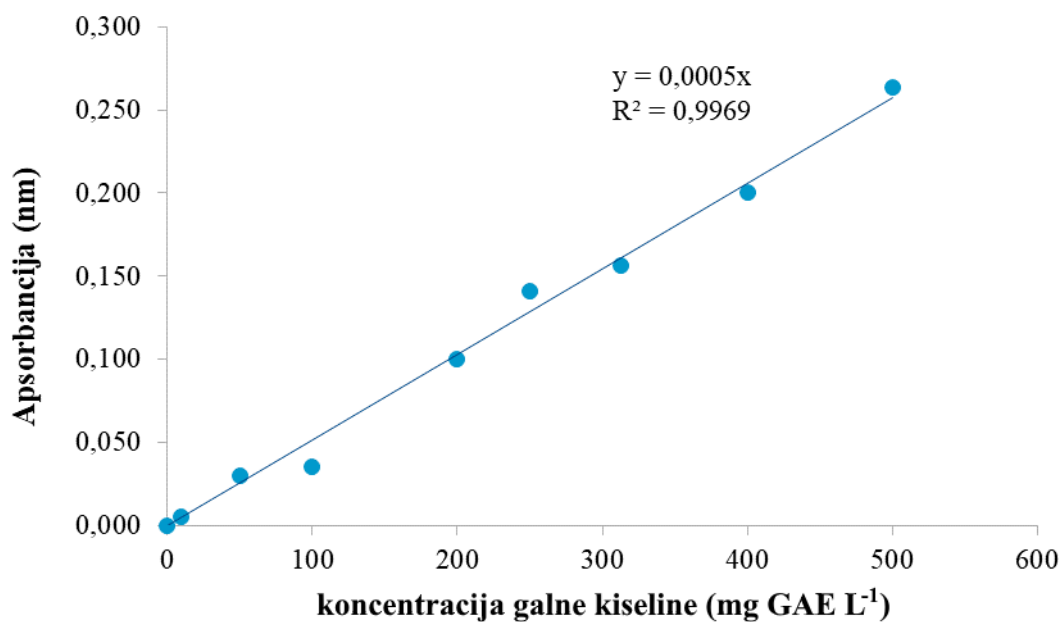
3.2.9.4. Određivanje ukupnog udjela polifenola (TPC)

Ukupni udio polifenola (engl. Total Phenolic Content, TPC) u određenom uzorku utvrđuje se na temelju reakcije prisutnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. To je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se, u interakciji s polifenolima iz uzorka, reduciraju u svoje okside. Redukcija je praćena pojavom plavog obojenja čiji je intezitet proporcionalan broju oksidirajućih skupina u fenolnim spojevima.

U epruvetu se doda 3,95 mL destilirane vode, 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 0,75 mL otopine natrijeva karbonata (20 %) i 50 µL uzorka. Dodatkom otopine karbonata pokreće reakciju. Uzorci se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se pomoću

spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke, uz iznimku dodatka 50 μL destilirane vode umjesto uzorka.

Ukupnih udio polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog dijagrama galne kiseline (slika 5), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) L^{-1} ili g^{-1} uzorka.



Slika 5. Baždarni dijagram za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0005x$$

[6]

Gdje je:

x – koncentracija galne kiseline mg GAE L^{-1}

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije (nm)

3.2.10. Blisko infracrvena spektroskopija

Pomoću NIR spektrometra (Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m) snimani su NIR spektri u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm. Sustav za snimanje NIR spektra sastoji se od računala sa instaliranim Control Development softverom Spec32, NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m spektrometra, monokromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i postolja s poklopcem u koji se stavlja kivetu od 3 mL s uzorkom. Postupak snimanja proveden je tako da se određena količina uzorka ulije u kivetu te se stavi u postolje sa poklopcem koje omogućuje snimanje spektra bez prisutstva okolne svjetlosti iz prostorije. Uzorci su rađeni u duplikatima, a svaki uzorak vodenog ekstrakta snimljen je deset puta.

3.2.11. Kemometrija i umjetne neuronske mreže

U svrhu obrade podataka iz NIR spektara korištena je kemometrijska metoda analize glavnih komponenti (PCA – principal component analysis), a tako dobiveni podaci korišteni su za kreiranje umjetne neuronske mreže. U oba slučaja je za obradu podataka korištena probna verzija softvera Statistica 13.3 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD). Analiza glavnih komponenti korištena je kako bi se izdvojile najznačajnije informacije iz opsežnog NIR spektra, budući da snimljeni dio spektra obuhvaća vrijednosti apsorbancije za valne duljine od 904-1699 nm. Na taj način su podaci spektra pretvoreni su u skup novih varijabli koje zovemo glavne komponente ili faktori. Rezultati PCA analize obično se prikazuju pomoću omjera dobivenih faktora gdje prvi faktor uvijek objašnjava najveći dio varijance, a ostali faktori sve manji dio. U ovom slučaju prvih 10 faktora PCA analize koji objašnjavaju 99,99 % varijabilnosti u podacima korišteni su kao ulazi za umjetne neuronske mreže, a izlazni podaci neuronskih mreža bile su izmjerene vrijednosti za: TDS, vodljivost, pH, suhu tvar, TPC, DPPH, FRAP i antioksidacijska aktivnost izmjerena Briggs-Rauscher reakcijom. Broj neurona prilikom računanja ANN bio je postavljen od 4 do 13. Kako su promatrana tri različita tipa uzoraka (ekstrakti, ekstrakti nakon adsorpcije i emulzije) razvijene su specifične neuronske mreže za svaki od tih slučajeva.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U nastavku je naveden sažetak svih rezultata dobivenih na temelju utvrđivanja fizikalnih i kemijskih svojstva za 5 biljnih ekstrakata samoniklog bilja (paprena metvica, matičnjak, kadulja, majčina dušica i lavanda) kao i njihovih međusobnih odnosa te veze sa blisko-infracrvenom spektroskopijom u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama.

Fizikalna svojstva ekstrakata prije adsorpcije u pogledu pH vrijednosti, vodljivosti, TDS-a i udjela suhe tvari, prikazana su u tablici 2, a kemijske analize (određivanje antioksidacijske aktivnost DPPH i FRAP metodama i TPC) u tablici 3.

Fizikalna svojstva ekstrakata nakon adsorpcije za pH vrijednost, vodljivost, TDS i udio suhe tvari, prikazana su u tablici 4, a kemijske analize (određivanje antioksidacijske aktivnost DPPH i FRAP metodama i TPC) u tablici 5.

U tablici 6 prikazane su pH vrijednosti, udio suhe tvari te vrijednosti vodljivosti i TDS-a za ekstrakte adsorbirane na mikrokapsule, a za antioksidacijsku aktivnost po DPPH i FRAP metodi te TPC rezultati se nalaze u tablici 7.

Slike 6-8 pokazuju mikroskopski prikaz unutarnje uređenosti emulzija s različitim emulgatorima (PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20 000).

U tablicama 8-10 prikazani su rezultati pH, vodljivosti i TDS za emulzije uz spomenute emulgatore, a u tablicama 11-13 antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP) i udio polifenola.

Posljednja provedena analiza bilo je određivanje antioksidacijske aktivnosti na temelju Briggs-Rauscher reakcije. Rezultati svih mjerenja prikazani su na slikama 9-14.

Na samom kraju (tablice 14 i 15) dan je prikaz predviđanja za sve rezultate primjenom umjetnih neuronskih mreža, na temelju podataka dobivenih NIR spektroskopijom i obrađenih PCA analizom.

4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA

4.1.1. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata

Tekući uzorci pripremljeni su ekstrakcijom osušenog biljnog materijala. Kako bi se ustanovila početna fizikalna svojstva uzoraka ispitan je udio ukupnih otopljenih tvari (TDS), vodljivost, pH vrijednost i udio suhe tvari. Sva ispitivanja provedena su na nerazrijeđenim uzorcima u duplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata prije adsorpcije

| Uzorak | TDS [mg L ⁻¹] | Vodljivost [μ S cm ⁻¹] | pH | Suha tvar [%] |
|-----------------|---------------------------|---|------|-------------------|
| Paprena metvica | 883,5 \pm 0,707 | 1766,5 \pm 2,121 | 5,90 | 0,720 \pm 0,021 |
| Matičnjak | 775,5 \pm 0,707 | 1551,5 \pm 0,707 | 5,80 | 0,584 \pm 0,022 |
| Kadulja | 587,0 \pm 1,414 | 1174,0 \pm 4,246 | 5,51 | 0,423 \pm 0,045 |
| Majčina dušica | 451,0 \pm 0,000 | 902,0 \pm 0,000 | 5,75 | 0,320 \pm 0,025 |
| Lavanda | 545,0 \pm 2,828 | 1089,5 \pm 4,950 | 5,02 | 0,458 \pm 0,039 |

Vrijednosti TDS-a bile su u rasponu od 451,0 mg L⁻¹ do 883,5 mg L⁻¹. Poredak biljnih ekstrakata od najmanje vrijednosti TDS-a ka najvećoj bio je: majčina dušica < lavanda < kadulja < matičnjak < paprena metvica. Identičan poredak zabilježen je i u slučaju električne vodljivosti uzoraka. Ponovno se paprena metvica pokazala kao ekstrakt s najvišom (1766,5 μ S cm⁻¹), a majčina dušica s najnižom vrijednosti za električnu vodljivost (902,0 μ S cm⁻¹). Takvi podaci ne čude, budući da je dobro poznata korelacija između udjela ukupnih otopljenih tvari i električne vodljivosti. U praksi je već dugo poznata činjenica kako u većini vodenih ekstrakata vrijednost električne vodljivosti prati TDS vrijednost, jer su značajan dio otopljenih tvari ustvari ioni, koji kako znamo provode električnu struju (Walton, 1989). Takav slučaj potvrđen je i ovaj put. S druge strane, povezanost pH vrijednosti s vodljivosti i TDS-om nije uočena. Ipak poredak uzoraka prema pH vrijednosti sličan je kao i kod Sarić (2020), gdje je poredak od najviše do najniže vrijednosti bio: paprena metvica > majčina dušica > matičnjak > kadulja > lavanda, dok je u ovom radu uzorak matičnjaka imao nešto višu pH vrijednost od uzorka ekstrakta majčine dušice. Potencijalan uzrok može biti različito geografsko podrijetlo biljaka. U slučaju udjela suhe tvari također nije uočena potpuna povezanost s vrijednostima pH, TDS i vodljivosti, iako su najviše vrijednosti zabilježene kod uzoraka paprene metvice (0,720 %) i matičnjaka (0,584

%). Ovaj podatak podudara se s vrijednostima pH, TDS i vodljivosti, gdje su ova dva ekstrakta također bila dominantna. Uz to, raspon vrijednosti od 0,320 % do 0,720 % je unutar raspona zabilježenog u radu Jurinjak Tušek i sur. (2020) koji je sezao od najviše vrijednosti od 0,750 % (paprena metvica) do 0,310 % (majčina dušica).

U već spomenutom istraživanju objavljenom ranije ove godine kojeg su proveli Jurinjak Tušek i sur. (2020), praćena su fizikalna svojstva za iste biljke. U njihovom radu najniža vrijednost vodljivosti i TDS-a uočena je kod ekstrakta lavande, a druga najniža kod ekstrakta majčine dušice. Iako je u ovom radu majčina dušica imala niže vrijednosti od lavande, ostaje činjenica kako su u oba slučaja ove biljke bile najniže rangirane za iste fizikalne parametre, a razlike se mogu pripisati drugačijem kemotipu, podrijetlu i godini berbe biljaka.

4.1.2. Kemijska svojstva biljnih ekstrakata prije adsorpcije

Istim uzorcima ispitana je antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC), pri čemu su za DPPH i FRAP metode pripremljeni uzorci razrijeđeni 20 puta, a za TPC metodu 50 puta, a vrijednosti (tablica 3) potom preračunate i izražene po masi sušenog bilja korištenog za pripremu ekstrakta.

Tablica 3. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC) biljnih ekstrakata prije adsorpcije

| Uzorak | DPPH [mmol TE g ⁻¹ biljke] | FRAP [mmol FeSO ₄ ×7H ₂ O g ⁻¹ biljke] | TPC [mg GAE g ⁻¹ biljke] |
|-----------------|--|---|--|
| Paprena metvica | 0,486±0,007 | 0,665±0,028 | 525,833±10,607 |
| Matičnjak | 0,655±0,068 | 0,938±0,051 | 603,333±21,213 |
| Kadulja | 0,294±0,001 | 0,451±0,007 | 318,333±7,071 |
| Majčina dušica | 0,158±0,003 | 0,311±0,029 | 340,833±166,170 |
| Lavanda | 0,215±0,026 | 0,383±0,026 | 188,333±14,142 |

Izmjerene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za obje metode pokazale su jednak redoslijed uzoraka s najvišom vrijednosti kod ekstrakta matičnjaka, zatim paprene metvice, kadulje,

lavande i konačno majčine dušice. Primjenom DPPH metode uzorci matičnjaka ($0,655 \pm 0,068$ mmol TE g^{-1} bilja) i paprene metvice ($0,486 \pm 0,007$ mmol TE g^{-1} bilja) pokazali su znatno višu antioksidacijsku aktivnost, u odnosu na ostala tri biljna ekstrakta. Isti je slučaj zabilježen i kod FRAP metode gdje su antioksidacijske aktivnosti matičnjaka i paprene metvice iznosile $0,938 \pm 0,051$, odnosno $0,665 \pm 0,028$ mmol $FeSO_4 \times 7H_2O$ g^{-1} bilja. Može se zaključiti kako se povezanost ove dvije metode pokazala točnom u ovom slučaju.

U slučaju određivanja ukupnog udjela polifenola (TPC) za ekstrakte matičnjaka i paprene metvice dobivene su više vrijednosti u odnosu na ostale. Ono što pomalo začuđuje jest činjenica kako se poredak ne podudara potpuno sa poretkom kada je ispitivana antioksidacijska aktivnost. I dok su na prvom i drugom mjestu po najvišoj antioksidacijskoj aktivnosti za obje metode, kao i za TPC matičnjak i paprena metvica, ekstrakti kadulje, majčina dušice i lavande nisu pokazale jednaku povezanost. Podaci drugih autora (Katalinić i sur., 2006; Sarić, 2020) upućuju na korelaciju između sadržaja polifenola i antioksidacijske aktivnosti, a nepravilnosti koje su ovdje prikazane mogu biti rezultat pogreške u pripremi uzorka na što upućuju i visoke vrijednosti standardne devijacije za TPC, osobito u slučaju ekstrakta majčine dušice.

Činjenica da su uzorci matičnjaka na vrhu u pogledu antioksidacijske aktivnosti kao i TPC-a potvrđuje ono što navode brojni drugi autori (Sentkowska i sur., 2015; Šic Žalbur i sur., 2016; Binello i sur., 2017), kada spominju matičnjak kao izrazito bogat izvor fenolnih spojeva. Također postoje i navodi (Saad i sur., 2015) koji svjedoče o povezanosti električne vodljivosti i antioksidacijske aktivnosti, što se gotovo potpuno pokazalo točno u ovom slučaju, uz jednu iznimku da je paprena metvica imala najvišu vodljivost, a matičnjak najvišu antioksidacijsku aktivnost.

4.2. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA NAKON ADSORPCIJE

4.2.1. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije

Nakon što su mikrokapsule alginata odstajale u ekstraktu i vezale dio bioaktivnih tvari na sebe, ispitan je udio ukupnih otopljenih tvari (TDS), vodljivost, pH vrijednost i udio suhe tvari nakon adsorpcije. Sva ispitivanja provedena su na nerazrijeđenim uzorcima u duplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije

| Uzorak | TDS [mg L ⁻¹] | Vodljivost [$\mu\text{S cm}^{-1}$] | pH | Suha tvar [%] |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|------|-------------------|
| Paprena metvica | 1215,0 \pm 4,242 | 2430,0 \pm 14,142 | 6,30 | 0,735 \pm 0,033 |
| Matičnjak | 1049,0 \pm 2,828 | 2095,0 \pm 7,071 | 5,57 | 0,620 \pm 0,017 |
| Kadulja | 961,5 \pm 2,121 | 1925,5 \pm 2,121 | 5,46 | 0,521 \pm 0,008 |
| Majčina dušica | 874,0 \pm 0,000 | 1748,0 \pm 0,000 | 5,67 | 0,362 \pm 0,039 |
| Lavanda | 1011,5 \pm 0,707 | 2020 \pm 0,000 | 4,96 | 0,524 \pm 0,050 |

U odnosu na uzorke ekstrakta prije adsorpcije, u ekstraktima nakon adsorpcije zabilježena je povišena vrijednost TDS i vodljivosti za sve uzorke. Vrijednosti TDS-a nakon adsorpcije sezale su u rasponu od 874,0 mg L⁻¹ do 1215,0 mg L⁻¹. Poredak biljnih ekstrakata od najviše vrijednosti TDS-a ka najnižoj bio je: paprena metvica > matičnjak > lavanda > kadulja > majčina dušica. Identičan poredak zabilježen je i u slučaju električne vodljivosti uzoraka. Ponovno se paprena metvica pokazala kao ekstrakt s najvišom (2430,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$), a majčina dušica s najnižom vrijednosti za električnu vodljivost (1748,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$). Poredak prema vrijednostima TDS-a i vodljivosti minimalno se razlikuje u odnosu na uzorke prije adsorpcije, s time što su lavanda i kadulja ovaj put zamijenile mjesto. Slično kao i kod Sarić (2020), povišene vrijednosti u odnosu na ekstrakte prije adsorpcije daju naslutiti kako je možda dio CaCl₂ iz otopine za prihvata mikro kapsula, zaostao u ekstraktima prilikom adsorpcije i tako doprinio povećanju ukupnih otopljenih tvari, pa tako i vodljivosti.

U slučaju pH vrijednosti kod svih uzoraka, osim paprene metvice (porast pH vrijednosti sa 5,90 na 6,30) došlo je do snižavanja pH vrijednosti. Ovakvi rezultati su u suprotnosti s onima kod Sarić (2020), gdje je zamijećen porast za sve uzorke, osim za mentu.

Udio suhe tvari za sve uzorke je slično kao i za TDS i vodljivost porastao, s rasponom vrijednosti od 0,735 % (paprena metvica) do 0,362 % (majčina dušica). Opći poredak od najviše do najniže vrijednosti udjela suhe tvari zadržan je u odnosu na ekstrakte prije adsorpcije.

4.2.2. Kemijska svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije

Pripremljeni su uzorci za ekstrakte nakon adsorpcije te im je također ispitana antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC), pri čemu su za analize uzorci razrijeđeni 20 puta, a vrijednosti (tablica 5) potom preračunate i izražene po masi sušenog bilja korištenog za pripremu ekstrakta

Tablica 5. Kemijska svojstva biljnih ekstrakata nakon adsorpcije

| Uzorak | DPPH [mmol TE g ⁻¹ biljke] | FRAP [mmol FeSO ₄ ×7H ₂ O g ⁻¹ biljke] | TPC [mg GAE g ⁻¹ biljke] |
|-----------------|--|---|--|
| Paprena metvica | 0,491±0,014 | 0,614±0,011 | 141,333±5,657 |
| Matičnjak | 0,747±0,023 | 0,892±0,009 | 215,333±25,456 |
| Kadulja | 0,305±0,000 | 0,413±0,059 | 88,333±1,414 |
| Majčina dušica | 0,233±0,008 | 0,280±0,005 | 48,333±9,899 |
| Lavanda | 0,239±0,030 | 0,373±0,063 | 73,333±65,054 |

Parametri koji ukazuju na antioksidacijsku aktivnost uzoraka, DPPH i FRAP, za ekstrakte nakon adsorpcije koji su prikazani u tablici 5, pokazali su različite vrijednosti u odnosu na početne uzorke (tablica 3). Iz podataka prije i nakon adsorpcije vidljivo je kako su se, suprotno očekivanju, vrijednosti raspona izmjerene DPPH metodom povisile sa 0,158-0,655 na 0,233-0,747 mmol TE g⁻¹ biljke. Moguće je kako je ovaj podatak povezan s neočekivanom promjenom pH vrijednosti spomenutom u prethodnom poglavlju, budući da je poznato kako H⁺ ioni mogu imati utjecaj na nepouzdanost DPPH metode (Zhong i Shahidi, 2015). S druge strane kod FRAP metode je zabilježeno očekivano smanjenje antioksidacijske aktivnosti s 0,311-0,938 na 0,280-0,892 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke. Isti slučaj pokazao se i kod ukupnog udjela polifenola. Ovdje je raspon vrijednosti bio od 48,333-215,333 mg GAE g⁻¹ biljke, u odnosu na vrijednosti prije adsorpcije gdje je raspon sezao od 188,333 do 603,333 mg GAE g⁻¹ biljke. S obzirom na uočeno iz tablice 3 i tablice 5, može se zaključiti da su mikrokapsule adsorbirale dio spojeva koji djeluju kao nosioci antioksidacijske aktivnosti. Ovo potvrđuju i izračunati udjeli polifenola u ekstraktima prije i nakon adsorpcije. Ponovno se kao dominantan uzorak za sve tri metode pokazao ekstrakt matičnjaka, dok je najmanju vrijednost pokazao ekstrakt majčine dušice. Poredak vrijednosti u ekstraktima nakon adsorpcije, ne odgovara potpuno po svim metodama

onome uočenom u ekstraktima prije adsorpcije. Ipak vidi se jasan trend gdje najviše vrijednosti za sva tri parametra ima matičnjak, zatim menta pa kadulja, dok se najniže vrijednosti uvijek mogu očekivati za lavandu i majčinu dušicu, kod kojih su uočene nepravilnosti za TPC zbog velikih vrijednosti standardne devijacije $\pm 166,170 \text{ mg GAE g}^{-1}$ (ekstrakt majčine dušice prije adsorpcije) i $\pm 65,054 \text{ mg GAE g}^{-1}$ (ekstrakt lavande nakon adsorpcije).

4.3. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA MIKROKAPSULA

4.3.1. Fizikalna svojstva mikrokapsula

Mikrokapsule koje su vezale na sebe dio ekstrakta otopljene su u natrijevom citratu i centrifugirane kako bi se izdvojio supernatant, te mu je određen TDS, vodljivost i pH vrijednost. Također, po 3 g mikrokapsula je odvojeno u svrhu određivanja udjela suhe tvari. Ovi fizikalni parametri prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Fizikalna svojstva mikrokapsula nakon vezanja ekstrakta

| Uzorak | TDS [mg L^{-1}] | Vodljivost [$\mu\text{S cm}^{-1}$] | pH | Suha tvar [%] |
|-----------------|----------------------------|--------------------------------------|------|-------------------|
| Paprena metvica | 3735,0 \pm 35,355 | 7470,0 \pm 70,711 | 7,32 | 7,315 \pm 0,045 |
| Matičnjak | 3655,0 \pm 35,355 | 7315,0 \pm 63,640 | 7,35 | 6,749 \pm 0,013 |
| Kadulja | 3185,0 \pm 63,639 | 6375,0 \pm 120,208 | 7,31 | 6,962 \pm 0,019 |
| Majčina dušica | 3530,0 \pm 28,284 | 7055,0 \pm 49,497 | 7,28 | 6,477 \pm 0,015 |
| Lavanda | 4000,0 \pm 28,284 | 8010,0 \pm 56,568 | 7,16 | 6,149 \pm 0,126 |

Na prvi pogled je vidljiv značajan porast vrijednosti za sve promatrane parametre. Ukupni udio otopljenih tvari primjetno je viši u odnosu na uzorke ekstrakata prije (tablica 2) i nakon adsorpcije (tablica 4). I dok su u prethodna dva slučaja najveću vrijednost TDS-a pokazali uzorci paprene metvice, sada je to bio ekstrakt lavande s $4000,0 \text{ mg L}^{-1}$. Do promjene je također došlo i u pogledu ekstrakta s najnižom izmjerenom vrijednosti, pa je umjesto ekstrakta majčine dušice, za inkapsulirane uzorke pri dnu bio ekstrakt kadulje s $3185,0 \text{ mg L}^{-1}$. Identične promjene dogodile su se i u pogledu električne vodljivosti uzoraka, što još jednom potvrđuje poznatu povezanost vodljivosti i TDS-a. Izmjereni raspon uzoraka bio je od $6375,0$ do $8010,0 \mu\text{S cm}^{-1}$. Općeniti poredak za ekstrakte prema vodljivosti i TDS-u od najniže do najviše vrijednosti bio

je: kadulja < majčina dušica < matičnjak < paprena metvica < lavanda. Kada se promotre pH vrijednosti u prethodna dva mjerenja i mjerenja iz tablice 6, može se zamijetiti kako je po prvi put pH iznosila više od 7. Razlike među uzorcima paprene metvice, matičnjaka, kadulje i majčine dušice su prilično niske, a sve ulaze u raspon od 7,28 do 7,35, a jedino osjetnije odstupanje je zabilježeno za ekstrakt lavande čija je pH vrijednost iznosila 7,16. Povišene vrijednosti TDS, vodljivosti i pH su najvjerojatnije rezultat kompleksnijeg sastava uzoraka. Konkretno, pretpostavka je da je na porast pH najveći utjecaj imala otopina natrijevog citrata u kojoj su mikrokapsule otapane. Moguće je da je, uz natrijev citrat, na značajno povišenje TDS-a i vodljivosti djelovao proces otapanja mikrokapsula, pri čemu je manji dio polimernih molekula natrijeva alginata mogao dospjeti u supernatant te tako sudjelovati u ukupnom udjelu otopljenih tvari. Poput uzoraka prije i nakon adsorpcije i za inkapsulirane uzorke je najveći udio suhe tvari određen za ekstrakt paprene metvice (7,315 %). Udio suhe tvari i za ostale uzorke bio je približno 10 puta viši u odnosu na najviše izmjerene vrijednosti u tablicama 2 i 4. Razlog tomu je što treba uzeti u obzir da je dio suhe tvari činio i sam materijal mikrokapsula, koje su bez vezanog ekstrakta imale suhu tvar u prosjeku $10,303 \pm 0,525$ %.

4.3.2. Kemijska svojstva mikrokapsula

U tablici 7 prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodama kao i ukupni udio polifenola. Uzorci su za potrebe analize razrijeđeni 20 puta, a sve vrijednosti su izražene po masi mikrokapsula (g^{-1}).

Tablica 7. Kemijska svojstva mikrokapsula nakon vezanja ekstrakta

| Uzorak | DPPH [mmol TE g^{-1} mikrokapsula] | FRAP [mmol $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ g^{-1} mikrokapsula] | TPC [mg GAE g^{-1} mikrokapsula] |
|-----------------|---|---|---|
| Paprena metvica | $0,0039 \pm 0,0007$ | $0,0055 \pm 0,0010$ | $2,500 \pm 0,071$ |
| Matičnjak | $0,0049 \pm 0,0002$ | $0,0103 \pm 0,0000$ | $3,300 \pm 0,495$ |
| Kadulja | $0,0033 \pm 0,0022$ | $0,0046 \pm 0,0005$ | $2,425 \pm 0,035$ |
| Majčina dušica | $0,0006 \pm 0,0000$ | $0,0033 \pm 0,0002$ | $1,400 \pm 0,495$ |
| Lavanda | $0,0016 \pm 0,0003$ | $0,0054 \pm 0,0015$ | $2,100 \pm 0,919$ |

Kao i kod uzoraka prije i nakon adsorpcije, tako je i za mikroinkapsulirane uzorke najvišu antioksidacijsku aktivnost od svih prema DPPH metodi imao ekstrakt matičnjaka (0,0049 mmol TE g⁻¹ mikrokapsula). Isto tako drugu najvišu vrijednost zadržao je uzorak ekstrakta paprene metvice (0,0039 mmol TE g⁻¹ mikrokapsula), treću ekstrakt kadulje (0,0033 mmol TE g⁻¹ mikrokapsula), zatim ekstrakt lavande (0,0016 mmol TE g⁻¹ mikrokapsula), a najmanju antioksidacijsku aktivnost imao je ekstrakt majčine dušice (0,0006 mmol TE g⁻¹ mikrokapsula). Ovakav slijed je podudaran s onim primijećenim kako za izvorne ekstrakte prije adsorpcije tako i za one nakon adsorpcije. Očuvanje ovakvog poretka nakon vezanja uzoraka na mikrokapsule zabilježen je i kod drugih autora. Primjerice, u istraživanju od Jasso de Rodríguez i sur. (2019) nakon adsorpcije na alginatne mikrokapsule nije došlo do promjena redoslijeda antioksidacijske aktivnosti po DPPH metodi za 3 vrste roda *Flourensia*. Međutim takav slučaj nije potpuno potvrđen kada se u obzir uzmu rezultati dobiveni FRAP metodom. Iznimku čine ekstrakti kadulje i lavande, koji su u odnosu na izvorne ekstrakte, u slučaju mikroinkapsuliranih uzoraka zamijenili mjesta u poretku. Vezano za to, ekstrakti lavande i kadulje su jedini koji ne pokazuju istu povezanost ako se usporede rezultati DPPH i FRAP metode za ekstrakte vezane na mikrokapsule.

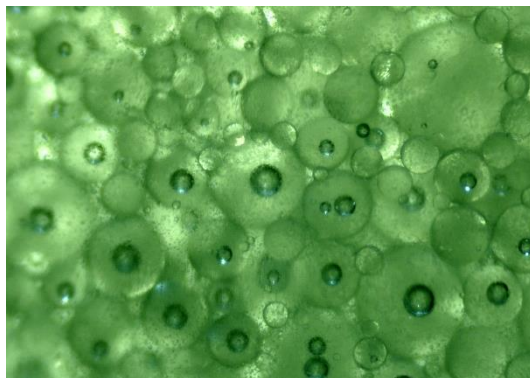
TPC vrijednost za adsorbirane ekstrakte bila je u rasponu od 1,400 do 3,300 mg GAE g⁻¹ mikrokapsula, pri čemu je ekstrakt matičnjaka, kao i u svim prethodno spomenutim uzorcima i ovaj put sadržavao najviše polifenola. Činjenica da sadržaj polifenola prati odnose među ekstraktima ustanovljene praćenjem antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, još jednom služi kao potvrda povezanosti antioksidanasa i polifenola.

4.4. EMULZIJE

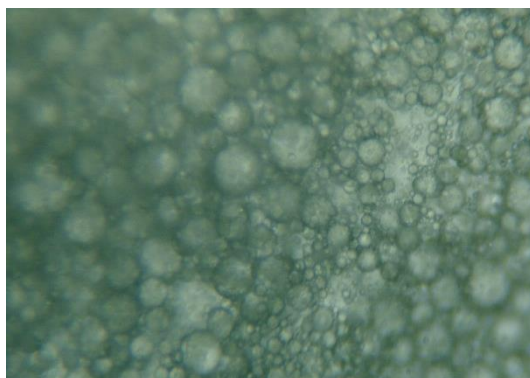
Uz mikroinkapsulaciju kao potencijalan način očuvanja stabilnosti i antioksidativnih svojstava tekućih uzoraka često se primjenjuje i proces emulgiranja. Za potrebe ovog rada pripremljene su emulzije ulja u vodenim biljnim ekstraktima koristeći polietilenglikol (molekulske mase 1500, 6000 i 20 000) kao emulgator. Kako bi se dobio bolji uvid u unutarnju strukturu načinjenih emulzija, uzorci su snimljeni pomoću mikroskopa opremljenog digitalnom kamerom. Potom su uzorcima ispitana još i fizikalna i kemijska svojstva.

4.4.1. Mikroskopski prikaz unutarnje strukture emulzija

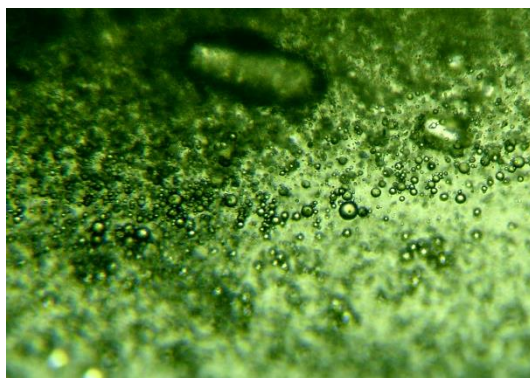
Ispod su prikazane digitalne fotografije snimljene pod mikroskopom emulzija ulja u vodenom ekstraktu paprene metvice uz primjenu emulgatora PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20 000.



Slika 6. Emulzija ulja u vodenom ekstraktu paprene metvice (PEG 1500)



Slika 7. Emulzija ulja u vodenom ekstraktu paprene metvice (PEG 6000)



Slika 8. Emulzija ulja u vodenom ekstraktu paprene metvice (PEG 20 000)

Na fotografijama su prikazani samo uzorci ekstrakta paprene metvice, ali su podaci reprezentativni i za druge ispitivane biljne ekstrakte. U prosjeku su dispergirane kapljice ulja (disperzna faza) bile gušće zbijene kada su za emulgiranje korišteni polietilenglikoli niže molekulske mase. Primijećeno je i na fotografijama drugih emulzija s biljnim ekstraktima uz PEG 20 000, kao i na slici 8, da su kapljice ulja, iako manje, više udaljene jedne od drugih nego što je vidljivo na slikama 6 i 7. To je u skladu s očekivanjima budući da je udio ulja za treći tip emulzije bio manji.

4.4.2. Fizikalna svojstva

U tablicama 8, 9 i 10 prikazani su rezultati određivanja TDS-a, vodljivosti za uzorke razrijeđene 20 puta i pH vrijednosti nerazrijeđenih emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima.

Tablica 8. Fizikalna svojstva emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima uz PEG 1500 kao emulgator

| Uzorak | TDS [mg L ⁻¹] | Vodljivost [μ S cm ⁻¹] | pH |
|-----------------|---------------------------|---|------|
| Paprena metvica | 40,9±1,556 | 82,4±3,323 | 5,51 |
| Matičnjak | 27,0±0,141 | 56,0±3,353 | 5,82 |
| Kadulja | 19,8±0,035 | 37,7±0,919 | 5,74 |
| Majčina dušica | 13,7±0,721 | 24,2±1,626 | 5,93 |
| Lavanda | 20,0±0,000 | 43,3±1,626 | 5,64 |

Najvišu vrijednost ukupnog udjela otopljenih tvari za uzorke prikazane u tablici 8, pokazao je ekstrakt paprene metvice, a iznosila je 40,9 mg L⁻¹. Najniža vrijednost izmjerena je za ekstrakt majčine dušice (13,7 mg L⁻¹). Isti uzorci imali su i najvišu (paprena metvica – 82,4 μ S cm⁻¹), odnosno najnižu (majčina dušica – 24,2 μ S cm⁻¹) vrijednost za električnu vodljivost. Kao i u svim dosadašnjim mjerenjima tako je i za ova uzorke potvrđena dobra povezanost za ova dva fizikalna parametra, s obzirom da je u oba poredak od najviše ka najnižoj izmjerenoj vrijednosti glasilo: paprena metvica > matičnjak > lavanda > kadulja > majčina dušica. Odnos između najviše i najniže pH vrijednosti za pojedine ekstrakte bila je suprotna, pa je za majčinu dušicu iznosila 5,93, a za paprenu metvicu 5,51.

Tablica 9. Fizikalna svojstva emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima uz PEG 6000 kao emulgator

| Uzorak | TDS [mg L ⁻¹] | Vodljivost [μ S cm ⁻¹] | pH |
|-----------------|---------------------------|---|------|
| Paprena metvica | 33,5±0,212 | 65,0±2,616 | 5,63 |
| Matičnjak | 26,9±0,071 | 56,8±0,849 | 5,68 |
| Kadulja | 20,9±0,354 | 41,4±0,141 | 5,80 |
| Majčina dušica | 13,4±0,827 | 27,2±1,344 | 6,07 |
| Lavanda | 22,6±0,354 | 44,8±0,495 | 5,60 |

Najvišu vrijednost ukupnog udjela otopljenih tvari za uzorke prikazane u tablici 9, pokazao je ekstrakt paprene metvice, a iznosila je 33,5 mg L⁻¹. Kao i za uzorke u tablici 8 najnižu izmjerenu vrijednost imao je ekstrakt majčine dušice (13,4 mg L⁻¹). Raspon od najniže (majčina dušica) do najviše (paprena metvica) izmjerene vodljivosti bio je između 27,2 μ S cm⁻¹ i 65,0 μ S cm⁻¹. Identičan poredak onome iz tablice 8 za TDS, kao i za vodljivost zabilježen je i za ove ekstrakte (paprena metvica > matičnjak > lavanda > kadulja > majčina dušica). I dok je najvišu pH vrijednost zadržao ekstrakt majčine dušice (6,07), primjenom PEG 6000 kao emulgatora, umjesto paprene metvice najniža vrijednost je izmjerena kod lavande (5,60).

Tablica 10. Fizikalna svojstva emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima uz PEG 20 000 kao emulgator

| Uzorak | TDS [mg L ⁻¹] | Vodljivost [μ S cm ⁻¹] | pH |
|-----------------|---------------------------|---|------|
| Paprena metvica | 36,2±1,202 | 75,3±2,263 | 5,79 |
| Matičnjak | 21,1±1,414 | 42,3±0,778 | 5,71 |
| Kadulja | 29,3±0,424 | 57,8±1,273 | 5,80 |
| Majčina dušica | 16,0±0,771 | 31,0±1,626 | 6,04 |
| Lavanda | 20,4±0,495 | 42,2±1,061 | 5,64 |

Za uzorke u kojima je kao emulgator korišten PEG 20 000 (tablica 10) uočene su neke promjene u odnosu na prilično slične rezultate kada je korišten PEG 1500, odnosno 6000. Iako su isti ekstrakti imali najviše (paprena metvica – 36,2 mg L⁻¹) i najmanje (majčina dušica – 16,0 mg L⁻¹) otopljenih tvari ostali, došlo je do promjene u poretku. Umjesto matičnjaka, sada je ekstrakt

kadulje imao drugu najvišu TDS vrijednost. za uzorke prikazane u tablici 8, pokazao je ekstrakt paprene metvice, a iznosila je 40,9 mg L⁻¹. Još jednom su TDS i vodljivost bili dobro povezani te nisu uočene nesukladnosti u njihovom odnosu. Kao i kada je primjenjivan emulgator PEG 6000, za majčinu dušicu je izmjerena najviša (6,04), a za lavandu najniža (5,64) pH vrijednost.

4.4.3. Kemijska svojstva

U tablicama 11, 12 i 13 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti i ukupnog udjela polifenola za emulzije ulja u vodenim ekstraktima uz različite emulgatore, pri čemu su za analize uzorci razrijeđeni 20 puta, a vrijednosti potom preračunate i korigirane za udio ulja i izražene po masi sušenog bilja korištenog za pripremu ekstrakta.

Tablica 11. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC) za emulzije vodenih ekstrakata i ulja uz PEG 1500 kao emulgator

| Uzorak | DPPH [mmol TE g ⁻¹ biljke] | FRAP [mmol FeSO ₄ ×7H ₂ O g ⁻¹ biljke] | TPC [mg GAE g ⁻¹ biljke] |
|-----------------|--|---|--|
| Paprena metvica | 0,494±0,000 | 0,671±0,024 | 310,769±6,527 |
| Matičnjak | 0,929±0,004 | 1,281±0,007 | 333,846±4,351 |
| Kadulja | 0,296±0,002 | 0,496±0,039 | 193,846±2,176 |
| Majčina dušica | 0,249±0,034 | 0,421±0,003 | 160,000±4,351 |
| Lavanda | 0,281±0,004 | 0,486±0,014 | 186,154±2,176 |

Iz tablice 11 vidi se kako je ekstrakt matičnjaka imao primjetno najvišu antioksidacijsku aktivnost određivanu DPPH i FRAP metodama kada je kao emulgator korišten PEG 1500. DPPH metoda za ekstrakt matičnjaka rezultirala je vrijednosti od 0,929 mmol TE g⁻¹ biljke, a za FRAP metodu antioksidacijska aktivnost iznosila je 1,281 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke. U odnosu na prvi sljedeći ekstrakt, paprenu metvicu (DPPH – 0,494 mmol TE g⁻¹ biljke; FRAP – 0,671 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke), to je gotovo dvostruko više. Donja granica antioksidacijske aktivnosti za DPPH metodu bila je 0,249 mmol TE g⁻¹ biljke, a za FRAP metodu 0,421 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke. Korelacija među ove dvije metode bila je potpuna, budući da je poredak ekstrakta bio identičan (matičnjak > paprena metvica > kadulja > lavanda > majčina dušica).

U usporedbi s antioksidacijskom aktivnosti, rezultati određivanja udjela polifenola nisu pokazali tako drastičnu razliku između prva dva ekstrakta. Ponovno je najveći udio polifenola određen za emulziju s ekstraktom matičnjaka (333,846 mg GAE g⁻¹ biljke), a nešto manje polifenola je sadržavala emulzija s ekstraktom paprene metvice (310,769 mg GAE g⁻¹ biljke). Preostala tri ekstrakta imali su dosta manje udjele polifenola u odnosu na matičnjak i paprenu metvicu, s time da među njima samima nije bilo jako izražene razlike. Slično je uočeno i kod antioksidacijske aktivnosti, gdje su se kadulja, lavanda i majčina dušica pokazali kao ekstrakti sa slabijim antioksidacijskim kapacitetom. Uz to podaci ukazuju na povezanost između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola, s obzirom da je poredak prema svim parametrima bio isti, što je potvrđeno i kod drugih autora (Katalinić i sur., 2006).

Tablica 12. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC) za emulzije vodenih ekstrakata i ulja uz PEG 6000 kao emulgator

| Uzorak | DPPH [mmol TE g ⁻¹ biljke] | FRAP [mmol FeSO ₄ ×7H ₂ O g ⁻¹ biljke] | TPC [mg GAE g ⁻¹ biljke] |
|-----------------|--|---|--|
| Paprena metvica | 0,542±0,013 | 0,833±0,077 | 352,308±17,406 |
| Matičnjak | 0,867±0,025 | 1,177±0,021 | 386,154±8,703 |
| Kadulja | 0,325±0,029 | 0,511±0,007 | 273,846±15,230 |
| Majčina dušica | 0,253±0,048 | 0,381±0,003 | 229,231±6,527 |
| Lavanda | 0,342±0,006 | 0,634±0,063 | 230,769±17,406 |

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti utvrđene DPPH metodom za emulzije kada je kao emulgirajuće sredstvo korišten PEG 6000 (tablica 12) bile su u rasponu od 0,253 do 0,867 mmol TE g⁻¹ biljke. I ovaj put je dominirala emulzija s ekstraktom matičnjaka. Druga po redu bila je emulzija s ekstraktom paprene metvice, te dalje emulzije s ekstraktom kadulje, lavande i majčine dušice. Ovakav poredak zadržan je i kada je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom, a najviša vrijednost iznosila je 1,177 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke (matičnjak) te najniža 0,381 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke (majčina dušica). Međutim kod primjene PEG 6000, za razliku od emulzija kod kojih je stabilnost održavao PEG 1500, nije uočena idealna podudarnost u poretku za sva tri parametra. Ipak, rezultati TPC analize prikazani u tablicama

11 i 12 upućuju na određeni stupanj povezanosti, budući da je u slučaju kada je korišten emulgator PEG 1500 i u slučaju kada je korišten PEG 6000 poredak ekstrakata s najvišim udjelom polifenola ka najnižem udjelu bio identičan.

Tablica 13. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom te ukupni udio polifenola (TPC) za emulzije vodenih ekstrakata i ulja uz PEG 20 000 kao emulgator

| Uzorak | DPPH [mmol TE g ⁻¹ biljke] | FRAP [mmol FeSO ₄ ×7H ₂ O g ⁻¹ biljke] | TPC [mg GAE g ⁻¹ biljke] |
|-----------------|--|---|--|
| Paprena metvica | 0,529±0,006 | 0,876±0,006 | 297,297±1,911 |
| Matičnjak | 0,357±0,028 | 0,627±0,012 | 245,946±9,555 |
| Kadulja | 0,819±0,026 | 1,372±0,029 | 343,243±13,378 |
| Majčina dušica | 0,218±0,000 | 0,570±0,089 | 155,405±5,733 |
| Lavanda | 0,254±0,031 | 0,522±0,065 | 222,973±5,733 |

Do najveće promjene u odnosu na prethodno uočene odnose među različitim biljkama došlo je u trećem tipu emulzija (tablica 13). Po prvi puta je zabilježeno da najveću antioksidacijsku aktivnost nemaju uzorci s ekstraktom matičnjaka. Sva tri parametra pokazala su kako u slučaju primjene PEG 20 000 postoji izražena preferencija za emulziju s ekstraktom kadulje. Tako je rezultat DPPH analize pokazao vrijednost od 0,819 mmol TE g⁻¹ biljke, rezultat FRAP analize 1,372 mmol FeSO₄×7H₂O g⁻¹ biljke, a ukupni udio polifenola vodenog ekstrakta kadulje u emulziji bio je 343,243 mg GAE g⁻¹ biljke. S druge strane u slučaju ekstrakta s najnižim vrijednostima za sva tri parametra nije uočena ista pravilnost, budući da je za DPPH i TPC najmanju vrijednost imala emulzija s ekstraktom majčine dušice, dok je najmanju antioksidacijsku aktivnost u primjeni FRAP metode imala lavanda. Također DPPH i TPC metode pokazale su potpunu međusobnu podudarnost u poretku za sve biljne ekstrakte, dok kod FRAP metode to nije bio slučaj.

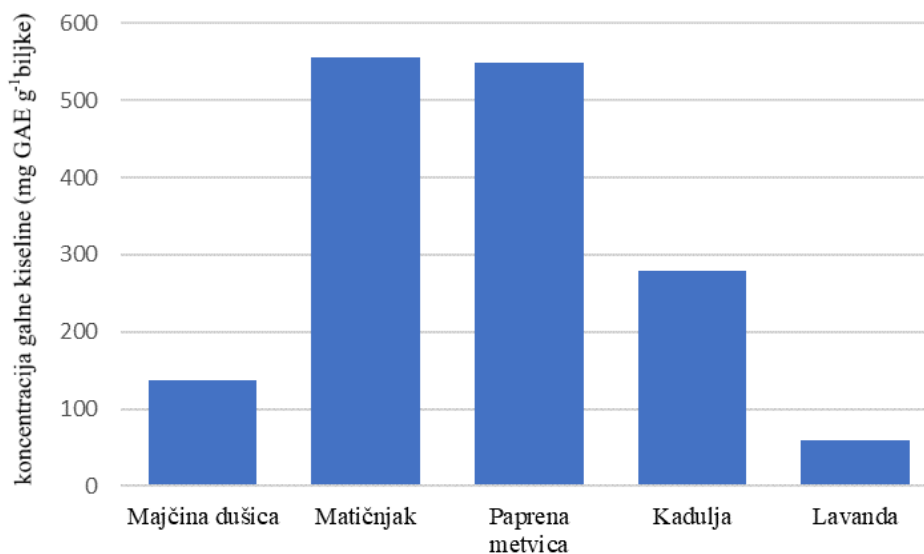
Općenito su najmanje međusobne razlike uočene među emulzijama u kojima su korišteni emulgatori PEG 1500 i PEG 6000, u odnosu na PEG 20 000. Budući da broj uz kraticu PEG (polietilenglikol) označava molekulsku masu, pretpostavka je da je ovo svojstvo moglo biti odgovorno za nastanak razlika među emulzijama, s obzirom da je razlika u molekulskoj masi

za PEG 1500 i PEG 6000 mnogo manja nego što je to skok do molekulske mase od 20 000. Rezultati sugeriraju da antioksidacijska aktivnost i sadržaj polifenola ukazuju na preferenciju za emulzije s ekstraktom matičnjaka kod primjene PEG 1500 i PEG 6000, dok je dodatak PEG 20 000 u emulziju imao najveći pozitivan utjecaj na ekstrakt kadulje. U prilog tome ide i ako se usporede rezultati kemijske analize izvornih ekstrakata s onima za emulzije. Generalno su veću podudarnost s izvornim ekstraktima pokazali uzorci emulzija s PEG 1500 i PEG 6000 kao emulgirajućim sredstvom.

Kao što je u opisu metode spomenuto, optimiranja za pripremu emulzija rađena su na temelju paprene metvice. Ovaj podatak je značajan ako se promotre rezultati tablica 11, 12 i 13. I dok je primjena različitog emulgatora imala ključan utjecaj na promjene udjela polifenola i antioksidacijske aktivnosti kadulje i matičnjaka (osobito kada je korišten PEG 20 000), vrijednosti za paprenu metvicu su u usporedbi s ovim ekstraktima manje oscilirale.

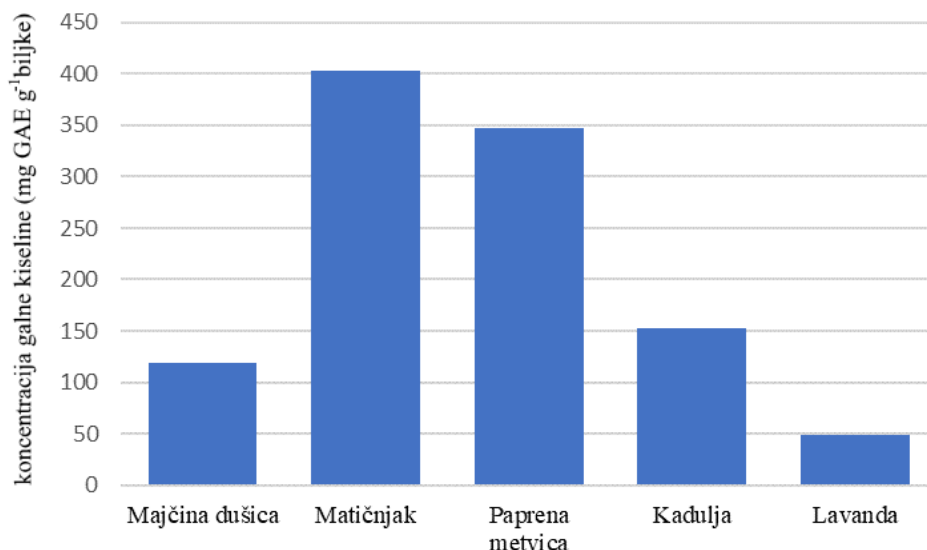
4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI POMOĆU BRIGGS-RAUSCHER REAKCIJE

Osim standardnih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, baziranih na spektrofotometriji, poput DPPH i FRAP metoda, u ovom radu je u tu svrhu provedeno i određivanje zasnovano na Briggs-Rauscher reakciji. Oscilatorna priroda ove reakcije omogućava da se vizualnim praćenjem promjene boje u odnosu na proteklo vrijeme od trenutka dodavanja uzorka dobije uvid u razliku među uzorcima u pogledu njihovog antioksidacijskog kapaciteta. Na slikama 9-14 su prikazani rezultati za biljne uzorke ekstrakata prije i nakon adsorpcije, ekstrakta vezanog za mikrokapsule, te za emulzije dobivene miješanjem suncokretovog ulja u vodenim ekstraktima paprene metvice, matičnjaka, kadulje, majčine dušice i lavande uz dodatak tri tipa polietilenglikola kao emulgirajućeg sredstva (PEG 1500, PEG 6000 TE PEG 20 000).



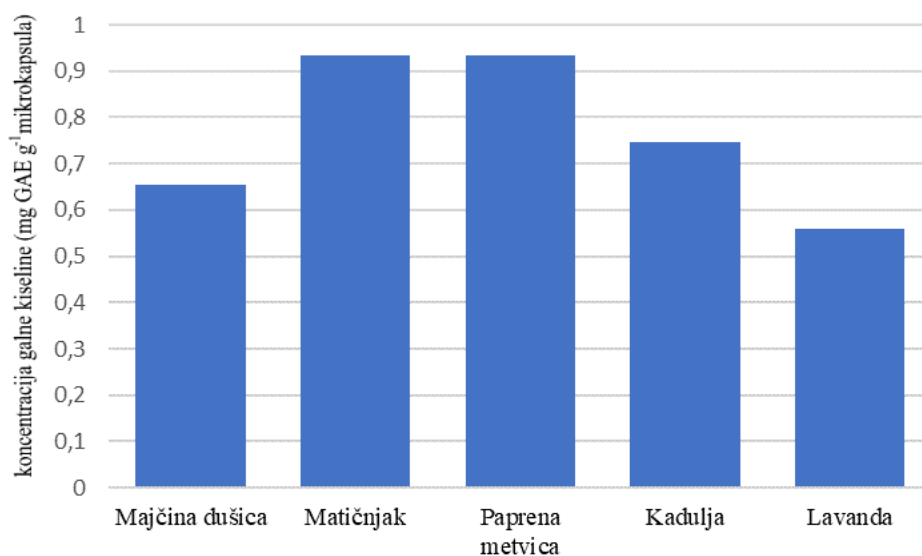
Slika 9. Antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata prije adsorpcije

Prvo mjerenje BR metodom provedeno je za izvorne uzorke ekstrakata prije adsorpcije (slika 9). Najviša izmjerena vrijednost antioksidacijske aktivnosti ustanovljena je za ekstrakt matičnjaka a iznosila je 556,136 mg GAE g⁻¹ biljke. Kao što se vidi iz grafičkog prikaza, ne mnogo manja vrijednost utvrđena je za ekstrakt paprene metvice (548,671 mg GAE g⁻¹ biljke). ekstrakti matičnjaka i paprene metvice. Treću najvišu vrijednost imao je ekstrakt kadulje (279,934 mg GAE g⁻¹ biljke), a gotovo upola manje ekstrakt majčine dušice (138,101 mg GAE g⁻¹ biljke). Daleko najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti u odnosu na prva dva ekstrakta za ovu metodu pokazao je ekstrakt lavande (59,720 mg GAE g⁻¹ biljke). U usporedbi s istim uzorcima, ali kada su korištene DPPH i FRAP metoda, može se uočiti poprilična sličnost u rezultatima. Jedina iznimka u odnosu na prethodne odnose među ekstraktima jest što je za obje spektrofotometrijske metode najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazao ekstrakt majčine dušice.



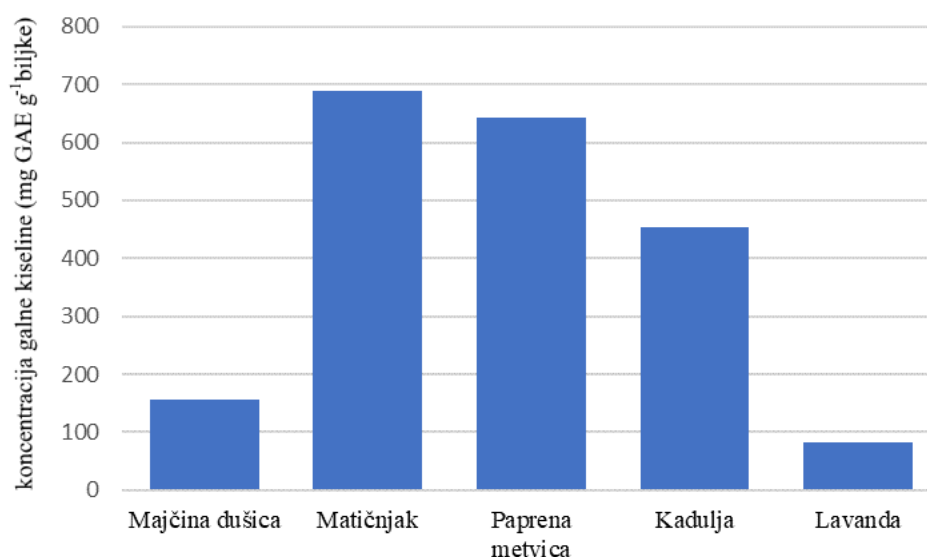
Slika 10. Antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata nakon adsorpcije

Kao što je to bio slučaj za ekstrakte nakon adsorpcije kod drugih autora (Sarić, 2020), a isto je uočeno primjenom već spomenutih spektrofotometrijskih metoda u ovom radu, ponovno je antioksidacijska aktivnost bila niža u odnosu na ekstrakte prije adsorpcije. Sada je raspon ekvivalenata galne kiseline bio od 48,52 do 403,105 mg g⁻¹ biljke (slika 10). Poredak od najviše do najniže vrijednosti ostao je nepromijenjen u usporedbi s rezultatima vidljivim na slici 9.



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata vezanih na mikrokapsule

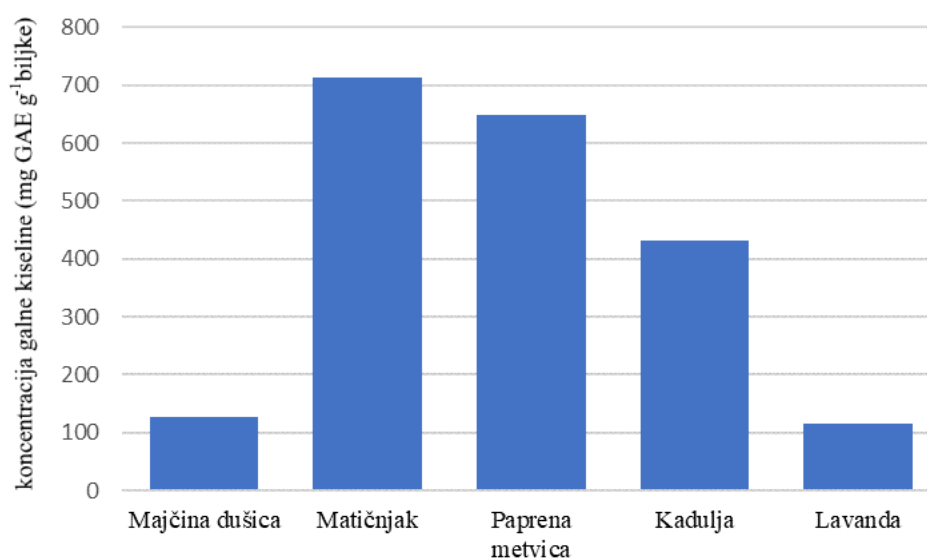
Za ekstrakte vezane na mikrokapsule uočena je jednaka vrijednost za dva ekstrakta s najvišom antioksidacijskom aktivnosti. I kod matičnjaka i kod paprene metvice je to iznosilo 0,933 mg GAE g⁻¹ mikrokapsula. Pogledom na slike 9, 10 i 11 mogao bi se izvući zaključak da su mikrokapsule mogle pokazati određeni afinitet za antioksidanse iz paprene metvice, s obzirom da je razlika između matičnjaka i paprene metvice za ekstrakte nakon adsorpcije primjetna. Međutim izglednije je da je pravi razlog ove pojave nesavršenost uvjeta eksperimenta, budući da su kao indikator služile promjene boje reakcijske smjese, a faktor ljudske pogreške mogao je imati utjecaj s obzirom da se rezultati temelje na izmjerenom vremenu u sekundama. Upravo zato je teško uvijek pouzdano odrediti točan trenutak kada dolazi do promjene boje. Tome u prilog idu i rezultati DPPH i FRAP analiza, gdje ovakav detalj nije uočen, no svakako bi bilo zanimljivo istražiti ovu pojavu, za koju nisu pronađene tvrdnje u drugim radovima.



Slika 12. Antioksidacijska aktivnost emulzija biljnih ekstrakata uz emulgator PEG 1500

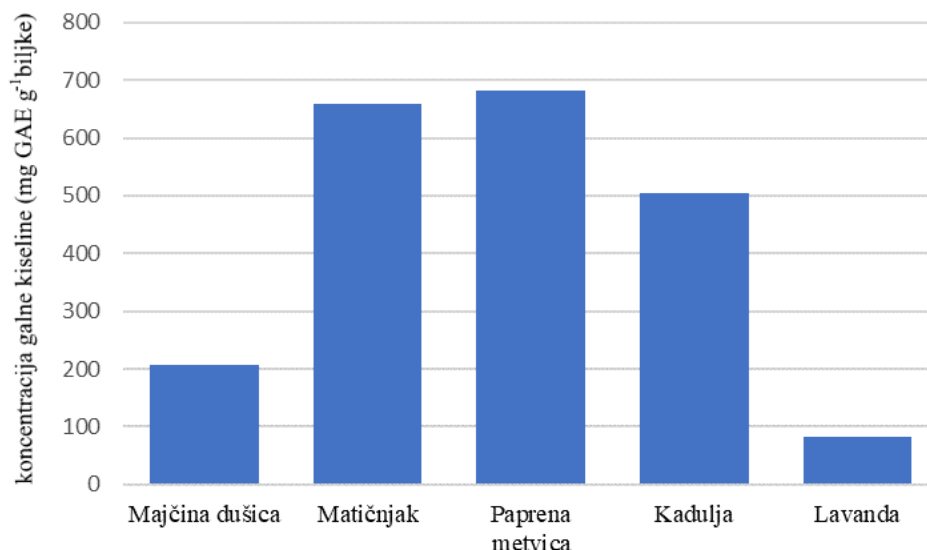
Podaci za antioksidacijsku aktivnost emulzija biljnih ekstrakata uz emulgator PEG 1500 (slika 12) ne razlikuju se mnogo na prvi pogled od onih za izvorne ekstrakte. Poredak od najviše do najniže određene vrijednosti opet je glasio: matičnjak > paprena metvica > kadulja > majčina dušica > lavanda. Maseni udio ekvivalenata galne kiseline među uzorcima bio je od 82,688 do 689,069 mg g⁻¹ biljke. Ako to usporedimo s rasponom kod izvornih ekstrakata prije adsorpcije (59,720 - 556,136 mg GAE g⁻¹ biljke) vidljivo je da je došlo do porasta izmjerene antioksidacijske aktivnosti kada je u vodeni ekstrakt dodano ulje. To je točno za svaku pojedinu

biljku. Isti slučaj je zabilježen i kada su primijenjene DPPH i FRAP metoda. Teško je sa sigurnošću objasniti zamijećenu pojavu, trebalo bi u budućnosti bolje istražiti što je moglo biti uzrok tome, s obzirom da nisu pronađeni relevantni dokazi u pretraživanju literature koja je prilično oskudna kada su u pitanju slični sustavi.



Slika 13. Antioksidacijska aktivnost emulzija biljnih ekstrakata uz emulgator PEG 6000

Kako je ranije ustanovljeno, razlika u molekularnoj masi za PEG 1500 i PEG 6000 nije toliko značajna da bi se to odrazilo na rezultate provedenih analiza u većoj mjeri. Stoga rezultati prikazani na slici 13 ne odstupaju pretjerano od onih na slici 12. Kao i za prethodno spomenute ekstrakte, uočen je opći porast vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s početnim ekstraktima. Maksimum antioksidacijske aktivnosti pokazao je uzorak emulzije s vodenim ekstraktom matičnjaka (712,038 mg GAE g⁻¹ biljke), a najmanju vrijednost emulzija s ekstraktom lavande (114,845 mg GAE g⁻¹ biljke).



Slika 14. Antioksidacijska aktivnost emulzija biljnih ekstrakata uz emulgator PEG 20 000

Primjena emulgatora PEG 20 000 imala je najviše utjecaja na antioksidacijsku aktivnost u prethodnim analizama. Isti slučaj potvrđen je i primjenom α Briggs-Rauscher reakcije. U odnosu na ostale rezultate (slike 9-13) kada je najviša vrijednost postignuta za ekstrakt matičnjaka, ovaj put to nije bio slučaj. Najveća antioksidacijska aktivnost pokazala se za emulziju s ekstraktom paprene metvice (681,930 mg GAE g⁻¹ biljke). Uzorak s ekstraktom matičnjaka imao je drugu najvišu izmjerenu antioksidacijsku aktivnost (659,737 mg GAE g⁻¹ biljke). Poredak za preostale tri biljke je ostao ne promijenjen u odnosu na dosad uočen trend. Kao i za emulzije s PEG 1500 i PEG 6000, tako je i ovaj put zapažen porast antioksidacijske aktivnosti u odnosu na početne ekstrakte.

Ako se usporede rezultati koji proizlaze iz primjene Briggs-Rauscher reakcije s drugim provedenim metodama za određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) te također s rezultatima određivanja ukupnog udjela polifenola može se uočiti zadovoljavajuća razina podudarnosti za većinu uzoraka. Gotovo sva mjerenja u promatranom uzorku upućuju na to da je ekstrakt matičnjaka sadržavao najviši udio polifenola pa samim tim i najviše antioksidanasa. Jedino značajnije odstupanje zabilježeno je u slučaju emulzije ulja u biljnim ekstraktima uz emulgator PEG 20 000. Samo tad ekstrakt matičnjaka nije imao najviše vrijednosti. Ekstrakt kadulje se pokazao dominantan za DPPH, FRAP i TPC metode, a ekstrakt paprene metvice po Briggs-Rauscher metodi. S druge strane ekstrakt majčine dušice je imao najnižu antioksidacijsku aktivnost i najmanji udio polifenola prema većini rezultata DPPH, FRAP i

TPC analiza. Suprotno tome ekstrakti lavande su pokazali minimum antioksidacijske aktivnosti za sve promatrane uzorke na temelju Briggs-Rauscher reakcije.

Premda u ovom istraživanju, a i kod drugih autora (Sentkowska i sur., 2015; Jakelić, 2016), svi rezultati upućuju na matičnjak kao biljku najbogatiju antioksidansima, u nekim drugim istraživanjima rezultati mogu biti potpuno suprotni, kao što je slučaj bio kod Jurinjak Tušek i sur., (2020) kada je ekstrakt majčine dušice bio dominantan za iste biljne vrste. Najveća prepreka u donošenju jednoznačnog suda o tome koja medicinska biljka sadrži najviše polifenola ili je najbogatija antioksidansima je ogromna varijabilnost uzoraka. Kako bi se dobila potpuno jasna slika bilo bi potrebno provesti opsežne analize pojedinih bioaktivnih tvari za svaki ekstrakt i tako s obzirom na geografsko porijeklo ili kemotip svake biljke.

4.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Uz procese ekstrakcije, adsorpcije vodenih ekstrakata na mikrokapsule i pripreme emulzija, također je korištena i blisko infracrvena spektroskopija s ciljem povezivanja NIR spektara snimljenih uzoraka s fizikalnim i kemijskim svojstvima. Zbog opsežne i neupotrebljive prirode samih NIR spektara, u tu svrhu prvobitno je korištena analiza glavnih komponenata (PCA – principal component analysis) kako bi se veliki broj varijabli sveo na prihvatljiv broj koji bi služio kao ulaz za neuronske mreže. Razvijene su tri različite neuronske mreže za svaki od tri slučaja:

- a) ekstrakti
- b) ekstrakti nakon adsorpcije
- c) emulzije.

U slučaju a) i b) najbolje su se pokazale neuronske mreže koje imaju omjer podataka koji je korišten za učenje, testiranje i validaciju 60:20:20, dok su se za slučaj c) najbolje pokazale neuronske mreže koje su imale omjere 50:30:20. Za svaki eksperiment odabrana je najbolja neuronska mreža (tablica 14) na temelju najviših vrijednosti za preciznost učenja, testiranja i validacije, uz najmanje pogreške.

Tablica 14. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža razvijenih za predviđanje električne vodljivosti, TDS-a, pH vrijednosti, suhe tvari, antioksidacijske aktivnosti (DPPH, FRAP, Briggs-Rauscher reakcija) i TPC u uzorcima ekstrakata, ekstrakata nakon adsorpcije i emulzija

| Uzorci | Arhitektura mreže | Preciznost učenja | Pogreška učenja | Preciznost testiranja | Pogreška testiranja | Preciznost validacije | Pogreška validacije | Skrivena aktivacijska funkcija | Izlazna aktivacijska funkcija |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Ekstrakti | 10-9-8 | 0,9980 | 0,0021 | 0,9361 | 0,0783 | 0,9323 | 0,0796 | Tanh | Exponential |
| Ekstrakti nakon adsorpcije | 10-7-8 | 0,9992 | 0,0008 | 0,9966 | 0,0043 | 0,9927 | 0,0105 | Tanh | Identity |
| Emulzije | 10-5-7 | 0,7458 | 0,1471 | 0,6414 | 0,2115 | 0,6202 | 0,2697 | Tanh | Tanh |

Prema tablici 14 vidljivo je da je najbolje slaganje umjetnih neuronskih mreža prilikom predviđanja fizikalnih i kemijskih svojstava na temelju NIR spektara dobiveno u slučaju ekstrakata nakon adsorpcije gdje su vrijednosti R^2 za učenje, testiranje i validaciju iznosile 0,9992, 0,9966 i 0,9927. Taj podatak pokazuje odlično slaganje predviđanja neuronske mreže na temelju eksperimentalno dobivenih vrijednosti, a vrlo male vrijednosti pogreške upućuju također i na njenu preciznost. Ukoliko se gleda arhitektura mreže vidljivo je da je u skrivenom sloju u ovom slučaju bilo 7 neurona dok je za uzorke izvornih ekstrakata u kojem su isto dobivene vrlo visoke vrijednosti R^2 za učenje, testiranje i validaciju bilo 9. To dodatno pokazuje stabilnost mreže jer je poželjno da se preko što manje neurona u skrivenom sloju može naučiti i predvidjeti rezultate. Najlošije se pokazala umjetna neuronska mreža u slučaju emulzija što je donekle i razumljivo, jer su ti uzorci bili homogenizirani pri $16\ 524\ \text{okr}\ \text{min}^{-1}$, uslijed čega dolazi do pojave mikro mjehurića. Moguće je da je polagano odvajanja faza i kretanje mjehurića uvelo dodatne smetnje, što predstavlja problem za NIR spektroskopija koja je jako osjetljiva na bilo kakve promjene prilikom snimanja uzoraka, Treba napomenuti i da je arhitektura ANN u trećem slučaju malo drugačija tj. ima 7 izlaza zbog toga što za uzorke emulzija nije mjerena suha tvar.

Kako su vrijednosti za prva dva slučaja iznad 0,90 dobivene umjetne neuronske mreže mogle bi se koristiti za kvantifikaciju, jer prema Lunze (1998). svaki model koji ima R^2 vrijednost veću od 0,90 smatra se modelom koji dobro opisuje podatke te se može koristiti za kvantifikaciju. Vrijednosti između 0,70 i 0,90 ukazuju na to da se modeli mogu smatrati prilično

preciznima, a vrijednosti ispod 0,70 ukazuju na to da model može samo kvalitativno razlikovati uzorke bez mogućnosti korištenja u kvantitativnom predviđanju (Mustafa i Turner, 2011).

Tablica 15. Rezultati predviđanja električne vodljivosti, TDS-a, pH vrijednosti, suhe tvari, antioksidacijske aktivnosti (DPPH, FRAP, Briggs-Rauscher reakcija) i TPC u uzorcima ekstrakata, ekstrakata nakon adsorpcije i emulzija

| Uzorak | Varijabla | Preciznost učenja | Preciznost testiranja | Preciznost validacije |
|-----------------------------------|------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ekstrakti | DPPH | 0,9987 | 0,9373 | 0,9569 |
| | FRAP | 0,9957 | 0,9290 | 0,9791 |
| | Suha tvar | 0,9973 | 0,9156 | 0,9439 |
| | TPC | 0,9989 | 0,9302 | 0,9395 |
| | BR | 0,9992 | 0,9657 | 0,9804 |
| | TDS | 0,9981 | 0,9696 | 0,8947 |
| | Vodljivost | 0,9980 | 0,9702 | 0,8962 |
| | pH | 0,9981 | 0,8712 | 0,8681 |
| Ekstrakti nakon adsorpcije | DPPH | 0,9992 | 0,9975 | 0,9878 |
| | FRAP | 0,9993 | 0,9976 | 0,9912 |
| | Suha tvar | 0,9992 | 0,9946 | 0,9953 |
| | TPC | 0,9992 | 0,9975 | 0,9914 |
| | BR | 0,9992 | 0,9975 | 0,9876 |
| | TDS | 0,9995 | 0,9963 | 0,9969 |
| | Vodljivost | 0,9995 | 0,9968 | 0,9961 |
| | pH | 0,9988 | 0,9947 | 0,9950 |
| Emulzije | DPPH | 0,6723 | 0,5592 | 0,5034 |
| | FRAP | 0,6675 | 0,4342 | 0,5031 |
| | TPC | 0,6868 | 0,4991 | 0,5469 |
| | BR | 0,8350 | 0,7434 | 0,7103 |
| | TDS | 0,7719 | 0,7222 | 0,6859 |
| | Vodljivost | 0,7576 | 0,7167 | 0,6747 |
| | pH | 0,8297 | 0,8152 | 0,7167 |

U tablici 15 nalazi se prošireni prikaz rezultata iz prethodne tablice. Za izvorne ekstrakte vrijednosti R^2 u pogledu preciznosti validacije su se pokazale nešto više za procjenu kemijskih parametara i udjela suhe tvari, nego za vodljivost, TDS i pH vrijednosti. Najbolji rezultati u svakom smislu uočeni su za ekstrakte nakon adsorpcije. U usporedbi s prva dva tipa uzoraka, očekivano najlošiji rezultati zabilježeni su za emulzije, premda bi se rezultati eventualno mogli upotrijebiti za preciznije predviđanje pH vrijednosti i za BR reakciju. Na temelju svega jasno je vidljivo da bi se NIR u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama mogao koristiti za kvantitativno određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata i ekstrakata nakon adsorpcije, dok u slučaju emulzija samo kao kvalitativna odrednica.

5. ZAKLJUČCI

1. Za sve ispitivane uzorke uočena je direktna povezanost između vrijednosti električne vodljivosti i ukupnog udjela otopljenih tvari, pri čemu je ekstrakt paprene metvice imao najviše vrijednosti za oba parametra, osim u slučaju mikrokapsula, kada je to bila lavanda.
2. Kod ekstrakta paprene metvice zabilježen je najveći udio suhe tvari u svim mjerenjima.
3. U uzorcima prije i nakon adsorpcije ekstrakt matičnjaka imao je najvišu antioksidacijsku aktivnost za DPPH i FRAP metodu, kao i najviši udio polifenola, a majčina dušica najmanju antioksidacijsku aktivnost za obje primijenjene metode. Pritom je uočeno smanjenje antioksidacijske aktivnosti nakon adsorpcije ekstrakta na mikrokapsule.
4. Adsorpcija ekstrakta na mikrokapsule nije znatno promijenila odnose u udjelima polifenola i antioksidacijske aktivnosti, budući da je ponovno dominantan ekstrakt bio matičnjak
5. Rezultati antioksidacijske aktivnosti za uzorke emulzija ulja u vodenim ekstraktima pokazali su porast vrijednosti u odnosu na izvorne ekstrakte. Primjena emulgatora PEG 1500 i PEG 6000 nije imala toliko značajan utjecaj koliko primjena PEG 20 000, gdje je uočena najviša antioksidacijska aktivnost i udio polifenola za ekstrakt kadulje.
6. Primjenom Briggs-Rauscher oscilatorne reakcije za određivanje antioksidacijske aktivnosti uočena je zadovoljavajuća podudarnost s DPPH i FRAP metodama kada su u pitanju ekstrakti matičnjaka, paprene metvice i kadulje. Iznimka tome ponovno je uočena kada je korišten emulgator PEG 20 000.
7. Prilikom predviđanja fizikalnih i kemijskih svojstava pomoću umjetnih neuronskih mreža na temelju NIR spektroskopije, izrazita preciznost uočena je za ekstrakte prije i nakon adsorpcije, stoga bi se ova metoda mogla upotrijebiti za kvantitativno određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava ovih uzoraka.

6. LITERATURA

Adaszyńska-Skwirzyńska, M. and Dziecioł, M. (2017) Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland. *Nat. Prod. Res.*, **31**, 2575-2580.

Altindal, D., Altindal, N. (2016) Sage (*Salvia officinalis*) Oils. U: Essential oils in food preservation, flavor and safety (Preedy, V. R., ured.), Academic Press, London, str. 715-721.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183-198.

Aziz, S., Rehman, H. (2008) Studies on the Chemical Constituents of *Thymus serpyllum*. *Turk. J. Chem.*, **32**, 605 – 614.

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

Basch, E., Foppa, I., Liebowitz, R., Nelson, J., Smith, M., Sollars, D., Ulbricht, C. (2004) Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *J. Herb. Pharmacother.*, **4**, 63-78.

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

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method. Enzymol.*, **299**, 15–27.

Binello, A., Cravotto, G., Boffa, L., Stevanato, L., Bellumori, M., Innocenti, M., Mulinacci, N. (2017) Efficient and selective green extraction of polyphenols from lemon balm. *C. R. Chim.* **20**, 921–926.

Bou, R., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F. (2014) Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *Lwt-Food Sci. Technol.*, **59**, 621-628.

- Cenić-Milošević, D., Tambur, Z., Bokonjić, D., Ivančajić, S., Stanojković, T., Grozdanić, N., Juranić, Z. (2013) Antiproliferative effects of some medicinal plants on hela cells. *Arch. Biol. Sci.* **65**, 65–70.
- Chen, L. (2015) Emulsifiers as food texture modifiers. U: *Modifying Food Texture*, (Chen, J., Rosenthal, A., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 27-49.
- De Kepper, P., Epstein, I. R. (1982) Mechanistic study of oscillations and bistability in the Briggs-Rauscher reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 49-55.
- De Sousa, A. C., Gattass, C. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Blank, A. F., Alves, P. B. (2004) *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 677-681.
- Denner, S.S., (2009) *Lavandula angustifolia* miller: english lavender. *Holist. Nurs. Pract.*, **23**, 57-64.
- Findlay, W. P., Bugay, D. E. (1998) Utilization of Fourier transform-Raman spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **16**, 921-930.
- Frezza, C., Venditti, A., Serafini, M., Bianco, A. (2019) Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae. U: *Studies in natural products chemistry*, (Rahman, A. U., ured.), Elsevier Applied Science, London/New York, str. 125-178.
- Furrow, S. D., Noyes, R. M. (1982) The oscillatory Briggs-Rauscher reaction. 1. Examination of subsystems. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 38-42.
- Gajdoš-Kljusurić, J., Đaković, S., Kruhac, I., Kovačević Ganić, K., Komes, D., Kurtanjek, Ž.. (2005) Application of Briggs-Rauscher reaction for measurement of antioxidant capacity of Croatian wine. *Acta Aliment. Hung.* **34**, 483-492.
- Galle Toplak, K. (2001a) Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb. str. 160-161.
- Galle Toplak, K. (2001b) Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb. str. 212-213.
- Galle Toplak, K. (2001c) Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb. str. 232-233.
- Gao, H., Khera, E., Lee, J.-K., Wen, F. (2016) *Immobilization of Multi-biocatalysts in Alginate Beads for Cofactor Regeneration and Improved Reusability*. *Jove-J. Vis. Exp.*, **110**, 1-9.
- Ghorbani, A., Esmailizadeh, M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.*, **7**, 433-440.

- Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.*, **88**, 1-12.
- Hegerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G., Sovik, K. N., Rechard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem*, **46**, 1887–1892.
- Hinneburg, I., Dorman, H.D., Hiltunen, R. (2006) Antioxidant activities of extracts selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, **97**, 122–129
- Hu, Y. T., Ting, Y., Hu, J. Y., Hsieh, S. C. (2017) Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *J. Food Drug Anal.*, **25**, 16-26.
- Huang. D., Boxin, O.U., Prior P.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1841-1856.
- Huang, Y., Kangas, L. J., Rasco, B. A. (2007) Applications of artificial neural networks (ANNs) in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**, 113-126.
- Jakelić, M. (2016) Jednostavni i parcijalno-linearni regresijski modeli primijenjeni na različitim svojstvima vodenih biljnih ekstrakata. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Jasso de Rodríguez, D., Puente-Romero, G. N., Díaz-Jiménez, L., Rodríguez-García, R., Ramírez-Rodríguez, H., Villarreal-Quintanilla, J. A., Flores-López, M. L., Carrillo-Lomelí, D. A., Genisheva, Z. A. (2019) *In vitro* gastrointestinal digestion of microencapsulated extracts of *Flourensia cernua*, *F. microphylla* and *F. retinophylla*. *Ind. Crops. Prod.*, **138**, 1-7.
- Jednačak T., Novak P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. u Ind.* **62**, 71–80
- Jurinjak Tušek, A., Marić, L., Benković, M., Valinger, D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. (2020) In-vitro digestion of the bioactives originating from the Lamiaceae family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J. Food Biochem.*, 1-12, doi: 10.1111/jfbc.13233.
- Jyothi, S.S., Seethadevi, A., Prabha, K.S., Muthuprasanna, P., Pavitra, P. (2012) Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, **3**, 509-531.
- Katalinić, V., Miloš, M., Kulišić, T., Jukić, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94**, 550-557.

- Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-422.
- Kolak, I., Šatović, Z. (2003) 'LAVANDA U KRAJOBRAZU', *Sjemenarstvo*, **20**, 47-54.
- Kolak, I., Šatović, Z., Rozić, I. (2001) PAPRENA METVICA (*Mentha piperita* L.), *Sjemenarstvo*, **18**, 215-227.
- Kradjel, C. (1991) An overview of near infrared spectroscopy: from an application's point of view. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **339**, 65-67.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J. (2006) Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Res. Int.*, **39**, 678-685.
- Long, J. R., Gregoriou, V. G., Gemperline, P. J. (1990) Spectroscopic calibration and quantitation using artificial neural networks. *Anal. Chem.*, **62**, 1791-1797.
- Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji*, Hinus, Zagreb, str. 305-313.
- Lunze, J., (1998) Qualitative modelling of dynamical systems: Motivation, methods, and prospective applications. *Math Comput Simulat.*, **46**, 465-483.
- Maksimović, Z., Stojanović, D., Sostarić, I., Dajić, Z., Ristić, M. (2008) Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (*Lamiaceae*) essential oil. *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 2036-2041.
- Maleš, Ž., Šipicki, S., Pejaković, T. I., Mitrović, I., Bojić M. (2016) Pripravci ljekovitih biljaka u liječenju psihičkih poremećaja, *Farm. Glas.* **72**, 845-854.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 727-747.
- McClements, D. J., Li, Y. (2010) Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv. Colloid Interfac.*, **159**, 213-228.
- McClements, D.J. (2015) *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, 3. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 289-373.

- Milevskaya, V. V., Prasad, S., Temerdashev, Z. A. (2019) Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the *Lamiaceae* and *Hypericaceae* families: A review. *Microchem. J.*, **145**, 1036-1049.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., & Simin, N. (2004) Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(*Lamiaceae*) essential oil *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2485-2489.
- Moharram, H.A., Youssef, M.M. (2014) Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.*, **11**, 31-42.
- Molina-Diaz, A., Ortega-Carmona, I., Pascual-Reguera, M. I. (1998) Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*, **47**, 531–536.
- Mustafa, A., Turner, C., (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta*, **703**, 8-18.
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Sener, B. (2012) Recent approaches towards selected lamiaceae plants for their prospective use in neuroprotection. U: *Studies in Natural Products Chemistry*, (Rahman, A. U., ured.), Elsevier Applied Science, London/New York, str. 397-415.
- Ozaki, Y., Genkawa, T., & Futami, Y. (2017) Near-infrared spectroscopy. U: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, 3. izd., (Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D., ured.), Elsevier. str. 40-49.
- Petrović, S. S., Ristić, M. S., Petrović, N. V., Lazić, M. L., Francišković, M., Petrović, S. D. (2014) Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Thymus serpyllum* L. *Hem. Ind.*, **68**, 389-397.
- Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2011) Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem. Anal. Biochem.*, **1**, 106-115.
- Prior, R.L, Wu. X., Schaich. K., (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics of foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302.
- Pushpangadan, P., Tewari, S. K. (2006). Peppermint. U: *Handbook of herbs and spices*, (Peter, K.V., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 460-481.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L. (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 586-621.
- Raja, R. R. (2012) Medicinally potential plants of *Labiatae* (*Lamiaceae*) family: an overview. *Res. J. Med. Plant*, **6**, 203-213.
- Rasouli, H., Farzaei, M.H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food Prop.*, **20**, 1700-1741.
- Saad, R., Asmani, F., Saad, M., Hussain, M., Khan, J., Kaleemullah, M., Othman, N.B., Tofgh, A., Yusuf, E. (2015) A new approach for predicting antioxidant property of herbal extracts. *Int. J. Pharm. Phytochem. Res.*, **7**, 166-174.
- Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., Salgueiro, L., Mulaudzi, R. B. (2019) *Thymus* spp. plants-Food applications and phytopharmacy properties. *Trends Food Sci. Tech.*, **85**, 287-306.
- Sarić, I. (2020) Usporedba bioraspoloživosti aktivnih tvari iz tekućih i mikroinkapsuliranih ekstrakata ljekovitog mediteranskog bilja. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Scheen, A. C., Albert, V. A. (2009) Molecular phylogenetics of the Leucas group (*Lamioideae*; *Lamiaceae*). *Syst. Bot.* **34**, 173-181.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., Ulrich, J. (2004) High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem. Eng. Technol.*, **27**, 361-368.
- Sentkowska, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2015) Polyphenolic composition and antioxidative properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract affected by different brewing processes. *Int. J. Food Prop.* **18**, 2009-2014.
- Shahidi, F., Han, X.Q. (1993) Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 501-547.
- Shakeri, A., Sahebkar, A., Javadi, B. (2016) *Melissa officinalis* L.—A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. ethnopharmacol.*, **188**, 204-228.
- Sharifi-Rad, M., Ozelik, B., Altın, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez Alarcón, K., Alarcón-Zapata, P., Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N., Leal, A.L.A.B. and Coutinho,

- H.D.M. (2018) *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends Food Sci. Tech.*, **80**, 242-263.
- Silva, P.T.D., Fries, L.L.M., Menezes, C.R.D., Holkem, A.T., Schwan, C.L., Wigmann, É.F., Bastos, J.D.O., Silva, C.D.B.D. (2014) Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, **44**, 1304-1311.
- Stahl-Biskup, E., Venskutonis, R. P. (2004). Thyme. U: Handbook of herbs and spices, (Peter, K.V., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 304-328.
- Šic Žalbur, J., Voća, S., Dobričević, N., Pliestić, S., Galić, A., Borčević, A., Borić, N. (2016) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *Int. Agrophys.* **30**, 1–10.
- Tadros, T. F. (2016) Emulsions: Formation, stability, industrial applications, de Gruyter GmbH: Berlin.
- Taneja, S. C., Chandra, S. (2012). Mint. U: Handbook of herbs and spices, (Peter, K.V., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 366-387.
- Tatar, B.C., Sumnu, G., Sahin, S. (2017) Rheology of emulsions. U: Advances in food rheology and its applications, (Ahmed, J., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 437-457.
- Tenore, G. C., Ciampaglia, R., Arnold, N. A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. (2011) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 238-243
- Tzima, K., Brunton, N.P., Rai, D.K. (2018) Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in *Lamiaceae* plants—A review. *Plants*, **7**, 25-55.
- Velings, N.M., Mestdagh, M.M. (1995) Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polym. Gels Netw.*, **3**, 311-330.
- Vukojević, V., Sørensen, P. G., Hynne, F. (1996) Predictive value of a model of the Briggs–Rauscher reaction fitted to quenching experiments. *J. Phys. Chem.*, **100**, 17175-17185.
- Walton, N. R. G. (1989) Electrical conductivity and total dissolved solids—what is their precise relationship? *Desalination*, **72**, 275-292

- Wesołowska, A., Grzeszczuk, M., Jadczyk, D., NAWROTEK, P., Struk, M. (2015) Comparison of the chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus serpyllum* essential oils. *Not. Bot. Horti. Agrobi.*, **43**, 432-438.
- Xu, Y., Zhan, C., Fan, L., Wang, L., Zheng, H. (2007) Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral sitespecific drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, **336**, 329-337.
- Yang, C. S., Chung, J. Y., Yang, G.Y., Chhabra, S. K., Lee, M.J. (2000) Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention. *J. Nutr.*, **130**, 472–478.
- Yang, H., Griffiths, P. R. (1999) Application of multilayer feed-forward neural networks to automated compound identification in low-resolution open-path FT-IR spectrometry. *Anal. Chem.*, **71**, 751-761.
- Zhang, S., Shang, W., Yang, X., Zhang, S., Zhang, X., Chen, J. (2013) Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of p-nitrophenol butyrate. *Bull. Korean Chem. Soc*, **34**, 2741-2746.
- Zhong, Y., Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. U: Handbook of antioxidants for food preservation, (Shahidi, F., ured.), Woodhead Publishing, London, str. 287-333.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink that reads "Zoran Bila". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end of the name.

Zoran Bila