

Formuliranje bombonskog proizvoda obogaćenog inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom trave ive (Teucrium montanum L.)

Haramustek, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:068237>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Laura Haramustek

**FORMULIRANJE BOMBONSKOG
PROIZVODA OBOGAĆENOG
INKAPSULIRANIM
POLIFENOLNIM EKSTRAKTOM
TRAVE IVE
*(Teucrium montanum L.)***

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

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Draženka Komes na ljubaznosti i stručnim smjericama tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Ana Mandura Jarić, mag. ing., na strpljenju, susretljivosti, prenesenom znanju te na svim savjetima i smjericama koji su omogućili izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i mojim najbližima na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

FORMULIRANJE BOMBONSKOG PROIZVODA OBOGAĆENOG INKAPSULIRANIM POLIFENOLNIM EKSTRAKTOM TRAVE IVE (*Teucrium montanum* L.)

Laura Haramustek, univ. bacc. ing. tehn. aliment.
0058213595

Sažetak: Cilj ovog rada je razvoj veganskog bombonskog proizvoda s polifenolnim inkapsulatom ekstrakta trave ive (*Teucrium montanum* L.) dobivenog sušenjem raspršivanjem, uz primjenu odabranih polimernih nosača (arapska guma, guar guma, karboksimetil celuloza, kolagen i karagenan).

Za procjenu uspješnosti sušenja raspršivanjem, inkapsulacijama je izračunat prinos, kao i inkapsulacijska učinkovitost i kapacitet punjenja, koji su također praćeni spektrofotometrijskim metodama određivanja udjela ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina, uz određivanje feniletanoidnih glikozida HPLC-DAD metodologijom. Dodatno je provedena fizikalno-kemijska i morfološka karakterizacija inkapsulata te je praćena kinetika otpuštanja (*in vitro* uvjeti) polifenolnih spojeva.

Uz visoku inkapsulacijsku učinkovitost (prosječno ukupni udio polifenola: 79,40 %, hidrokscimetnih kiselina: 85,02 %), karboksimetil celuloza istaknula se kao najuspješniji nosač za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta te je navedeni inkapsulat implementiran u funkcionalni bombonski proizvod. Uz različite omjere kukuruznog i kuzu škroba, razvijeno je 5 formulacija bombonskih proizvoda s čokoladnim punjenjem te je provedena analiza njihovih fizikalno-kemijskih, bioaktivnih i senzorskih svojstava.

Ključne riječi: gumeni bomboni, polifenoli, sušenje raspršivanjem, škrob, trava iva

Rad sadrži: 72 stranica, 25 slika, 9 tablica, 95 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (član)
4. prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujan 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Tehnology and Biotehnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Tehnology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Tehnology

Graduate university study programme: Food Engineering

FORMULATION OF A CANDY PRODUCT ENRICHED WITH ENCAPSULATED POLYPHENOLIC EXTRACT OF MOUNTAIN GERMANDER (*Teucrium montanum* L.)

Laura Haramustek, univ. bacc. ing. tehn. aliment.

0058213595

Abstract: This paper aims to create a vegan candy with a polyphenolic extract from mountain germander, using spray drying with polymer carriers (arabic gum, guar gum, carboxymethyl cellulose, collagen and carrageenan). The success of the spray drying process was evaluated through yield, encapsulating efficiency and loading capacity calculations, employing spectrophotometric methods for polyphenol and hydroxycinnamic acid content determination and HPLC-DAD for phenylethanoid glycosides. Physico-chemical and morphological characterization of the encapsulates was conducted, along with monitoring of polyphenolic compound release kinetics under *in vitro* conditions.

Carboxymethyl cellulose exhibited high encapsulating efficiency (mean total phenolic content: 79.40 %, hydroxycinnamic acids: 85.02 %), making it the preferred carrier for the polyphenolic extract used in a functional candy product. The study also developed five chocolate-filled candy formulations with varying proportions of corn and kuzu starch, subjecting them to analysis for physico-chemical, bioactive, and sensory properties.

Keywords: *gummy candies, mountain germander, polyphenols, spray drying, starch*

Thesis contains: 72 pages, 25 figures, 9 tables, 95 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Draženka Komes, PhD, Full professor

Tehnickal support and assistance: Ana Mandura Jarić, MSc

Reviewers:

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

Thesis defended: September 22nd, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TRADICIONALNE LJEKOVITE BILJNE VRSTE	3
2.2. TRAVA IVA (<i>Teucrium montanum</i> L.)	4
2.2.1. Bioaktivni sastav trave ive	5
2.3. INKAPSULACIJA	6
2.3.1. Sušenje raspršivanjem	8
2.3.2. Nosači za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem.....	10
2.4. BOMBONSKI PROIZVODI	12
2.4.1. Gumeni bomboni.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJAL	16
3.1.1. Biljni materijal.....	16
3.1.2. Materijali korišteni za proizvodnju funkcionalnih gumenih bombona	16
3.1.3. Kemikalije	16
3.1.4. Pribor i aparatura.....	18
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta trave ive	20
3.2.2. Bioaktivna karakterizacija ekstrakta	20
3.2.2.1. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina (HC).....	20
3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC).....	21
3.2.2.3. Identifikacija nepoznatih polifenolnih komponenti primjenom LC-Q-TOF-MS/MS sustava	22
3.2.2.4. Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)	23
3.2.3. Priprema polimernih otopina ekstrakta	24
3.2.3.1. Određivanje prinosa procesa sušenja raspršivanjem.....	25
3.2.4. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika inkapsulata.....	26
3.2.4.1. Određivanje udjela suhe tvari polimernih otopina i inkapsulata.....	26
3.2.4.2. Nasipna gustoća.....	26
3.2.4.3. Močivost.....	28
3.2.5. Morfološka karakterizacija prahova skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)	28
3.2.6. Određivanje bioaktivne karakterizacije inkapsulata	28
3.2.6.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti i kapaciteta punjenja inkapsulata	28
3.2.6.2. Određivanje HC-a	29
3.2.6.3. Određivanje TPC-a.....	29
3.2.6.4. Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida HPLC-DAD metodom....	29

3.2.7.	<i>In vitro</i> gastrointestinalna digestija	30
3.2.8.	Razvoj i analiza funkcionalnih gumenih bombona	31
3.2.8.1.	Priprema bombonskih receptura i punjenja.....	31
3.2.8.2.	Određivanje udjela suhe tvari.....	32
3.2.8.3.	Odmašćivanje uzoraka	32
3.2.8.4.	Ekstrakcija polifenolnih spojeva i metilksantina iz odmašćenih uzoraka...	33
3.2.8.5.	Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida i metilksantina HPLC-DAD metodom	33
3.2.8.6.	Teksturalna svojstva.....	33
3.2.8.7.	Senzorska analiza	34
3.2.8.8.	<i>In vitro</i> digestija najbolje ocijenjenog bombonskog proizvoda u simuliranim uvjetima probavnog sustava	34
3.2.9.	Obrada podataka.....	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1.	Rezultati bioaktivnog sastava ekstrakta trave ive.....	37
4.2.	Prinos procesa sušenja raspršivanjem	37
4.3.	Fizikalno-kemijska karakterizacija čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem	39
4.3.1.	Udio suhe tvari inkapsulata	40
4.3.2.	Nasipna gustoća, Carr indeks i Hausnerov omjer	40
4.3.3.	Močivost.....	41
4.4.	Bioaktivna karakterizacija inkapsulata	42
4.4.1.	Inkapsulacijska učinkovitost	42
4.4.2.	Kapacitet punjenja.....	45
4.5.	Morfološka karakterizacija inkapsulata skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)	48
4.6.	<i>In vitro</i> digestija inkapsulata u simuliranim uvjetima probavnog sustava.....	51
4.7.	Analiza formuliranih bombonskih proizvoda	55
4.7.1.	Izgled bombonskih proizvoda	55
4.7.2.	Određivanje udjela suhe tvari.....	55
4.7.3.	Bioaktivna karakterizacija.....	56
4.7.4.	Teksturalna svojstva	57
4.7.5.	Senzorska svojstva	58
4.7.6.	<i>In vitro</i> digestija u simuliranim uvjetima probavnog sustava	59
5.	ZAKLJUČAK	61
6.	LITERATURA.....	62

1. UVOD

Industrija bombona treći je vrlo atraktivan segment konditorske industrije s vrlo dinamičnim globalnim tržištem koje otvara različite mogućnosti razvoja inovativnih funkcionalnih formulacija. Naime, porastom popularizacije održivog razvoja i jačanja svijesti o „pravilnoj“ prehrani te povezanosti prehrane i zdravlja potražnja za funkcionalnom hranom kontinuirano se povećava. Sukladno tome, jača trend konzumacije funkcionalnih prehrambenih proizvoda, uključujući konditorske, koji su obogaćeni biljnim ekstraktima kao izvorima različitih bioaktivnih komponenti, poput polifenola, vitamina, mineralnih tvari i dr. Među njima, osobito su atraktivni polifenolni spojevi definirani kao sekundarni biljni metaboliti koji pokazuju određene biološke učinke u ljudskom organizmu, poput antioksidacijskog, antikancerogenog i dr. Iako su naširoko proučavani zbog svojih potencijalnih pozitivnih učinaka na ljudske metaboličke procese, obzirom na relativnu nestabilnost, tj. sklonost oksidaciji i degradaciji pri uvjetima visoke temperature, visokog tlaka i određenih pH vrijednosti, kao i potencijalno negativan utjecaj na senzorska svojstva, primjena polifenola u prehrambenoj industriji prilično je ograničena.

Stoga je potrebno koristiti tehnike koje mogu zaštititi stabilnost ovih funkcionalnih komponenti, omogućiti njihovu primjenu u različitim prehrambenim matriksima i omogućiti im bolju apsorpciju u ljudskom probavnom sustavu (Chew i sur., 2019). U tu svrhu veliku primjenu imaju različite inkapsulacijske tehnike, među kojima se zbog praktičnosti i ekonomičnosti, vrlo često u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji koristi sušenje raspršivanjem.

U ovom radu kao glavni izvor polifenolnih spojeva korištena je trava iva (*Teucrium montanum* L.) koja ima dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini. Cilj istraživanja je inkapsulacija polifenolnih spojeva ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjem i primjena dobivenog inkapsulata u razvoju formulacija funkcionalnog bombonskog proizvoda. Kako bi se dobio inkapsulat najboljih karakteristika, provest će se bioaktivna, fizikalno-kemijska i morfološka karakterizacija inkapsulata, kao i *in vitro* digestija u simuliranim uvjetima probavnog sustava. U formuliranju funkcionalnog, veganskog bombonskog proizvoda, zadovoljavajućih senzorskih svojstava, koristit će se škrobne sirovine kao zamjena za želatinu u proizvodnji bombonskog plašta, dok će odabrani inkapsulat biti inkorporiran u čokoladno bombonsko punjenje. Određivanjem udjela suhe tvari, bioaktivnom karakterizacijom

koristeći HPLC-DAD (udio pojedinačnih feniletanoidnih glikozida i metilksantina), kao i analizom teksturalnih svojstava, okarakterizirat će se formulirane bombonske recepture. Na temelju rezultata senzorske analize odabrat će se najprihvatljiviji bombonski proizvod koji će se podvrgnuti *in vitro* digestiji u simuliranim uvjetima probavnog sustava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRADICIONALNE LJEKOVITE BILJNE VRSTE

Dokazi o uporabi ljekovitog bilja u terapijske svrhe datiraju još prije 5000 godina u vrijeme Sumerana i u vrijeme kineskog cara Shen Nunga, oko 2500. godine prije Krista (Petrovka, 2012). Terapijska primjena ljekovitog bilja pripisuje se prisutnosti širokog spektra sekundarnih metabolita ili fitokemikalija koje biljke uglavnom sintetiziraju kao dio njihovog obrambenog sustava od bolesti i biljojeda, a mogu se pronaći u korijenu, rizomima, gomoljima, lišću, nadzemnim dijelovima, cvijeću, voću i sjemenkama. To su primjerice alkaloidi, saponini, flavonoidi, glikozidi i fenoli koji svi imaju različita farmakološka djelovanja što ih svrstava u poželjne funkcionalne sastojke (Carović-Stanko i sur., 2016). Kao kemijski varijabilni sekundarni metaboliti, sintetizirani iz različitih dijelova biljke i u različitim vegetacijskim fazama, antioksidansi su najaktivnije proučavani sastojci ljekovitih biljaka. Najvažniji antioksidansi su polifenoli (fenolne kiseline, flavonoidi, antocijani, lignani i stilbeni), terpeni, askorbinska kiselina i tokoferoli.

Uobičajeno korištenim ljekovitim biljkama poznatim širom svijeta pripadaju biljne vrste iz nekoliko obitelji, kao što su *Lamiaceae* (ružmarin, kadulja, origano, mažuran, bosiljak, majčina dušica, metvice, matičnjaka), *Apiaceae* (kumin, komorač, kim), *Zingiberaceae* (kurkuma, đumbir), *Ginkgoaceae* (ginko), *Asteraceae* (kamilica) i *Myrtaceae* (eukaliptus) (Škrovánková i sur., 2012). Većina biljaka obitelji *Lamiaceae* (usnače) izrazito su aromatična i sadrže eterična ulja. Aromatična eterična ulja prisutna u listovima, ali i u svim nadzemnim dijelovima biljke koriste se u proizvodnji kozmetike, aroma, mirisa, parfema, pesticida, lijekova, ali i prehrambenih proizvoda. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), origano (*Origanum vulgare*) i majčina dušica (*Thymus vulgaris*) jedni su od često korištenih konzervansa u mesnoj industriji zbog svojih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava te posljedično produljenja roka trajanja mesnih proizvoda što se prepisuje prisutnosti bioaktivnih spojeva. Koriste se svježi, osušeni kao ekstrakti ili eterična ulja. Glavni predstavnik obitelji *Ginkgoaceae* (ginkovke), *Ginkgo biloba* L. je ljekovita biljka više od 2000 godina koja se primjenjuje u medicinske svrhe (liječenje kancerogenih, neuroloških, kardiovaskularnih, kožnih, respiratornih i drugih bolesti).

Značajna otkrića lijekova iz biljaka zabilježena su početkom 19. stoljeća kada je iz opijuma uspješno izoliran morfin što je potaknulo ispitivanje drugih ljekovitih biljaka (Atanasov i sur., 2015). U farmaceutskoj industriji ljekovite bilje je posebno cijenjeno te većina korištenih lijekova ima biljne ekstrakte kao glavne sastojke (Rehman i sur., 2021; Škrovánková i sur., 2012). Bogatstvo biološki aktivnih tvari te konzervirajući učinak zbog antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava također omogućuje primjenu ljekovitih biljaka u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

2.2. TRAVA IVA (*Teucrium montanum* L.)

S više od 300 vrsta, *Teucrium* je jedan od najvećih rodova obitelji *Lamiaceae* (usnače). Vrste roda *Teucrium* uglavnom su višegodišnje zeljaste biljke, grmovi ili šikare, dok je samo malo jednogodišnjih vrsta, a rasprostranjene su u različitim klimatskim uvjetima, kao i na različitim tipovima staništa, posebice u mediteranskoj regiji (Stanković, 2020). *Teucrium montanum* L. (slika 1) višegodišnja je zeljasta grmolika biljka koja cvjeta od svibnja do kraja ljeta te je rasprostranjena u južnoj i istočnoj Europi, području zapadnog Sredozemlja i u planinama južnog Arapskog poluotoka. (Stanković, 2020; Milošević-Djordjević i sur., 2013). Cvjetovi su blijedožute boje s 1 do 3 cvjeta grupirana na vrhu grana. Može se naći na termofilnim vapnenačkim i serpentinskim stijenama, na suhim planinskim livadama i na rubovima šuma tj. na staništima od 30 do 2000 m nadmorske visine, no najveći broj nalazišta je na nadmorskoj visini od 500-1000 m.



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

2.2.1. Bioaktivni sastav trave ive

Vrste roda *Teucrium* vrlo su bogate raznim sekundarnim metabolitima značajnih bioloških učinaka kao što su monoterpeni, iridoidi, seskviterpeni, diterpeni, steroli, saponini, polifenolni spojevi, flavanoidi, tanini, kumarini, glikozidi, alkaloidi i eterična ulja.

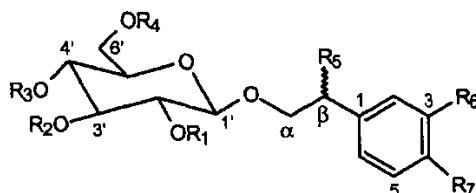
Polifenolni spojevi su sveprisutni u biljkama gdje se mogu naći u različitim kemijskim strukturama, od jednostavne fenolne molekule do složenih polimera visoke molekulske mase. S fiziološkog aspekta, polifenolni spojevi poznati su po snažnoj antioksidacijskoj aktivnosti koja je rezultat odgovarajućeg rasporeda i prisutnosti hidroksilnih skupina izravno vezanih na aromatski prsten (Stanković, 2020; Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Uobičajena podjela polifenola je na fenolne kiseline, kumarine, flavonoide, stiblene i lignane.

Do sada je detektirano 78 različitih fenolnih spojeva kod vrsta *Teucrium* (Stanković, 2020), a Mitreski i sur. (2014), koristeći napredniju kromatografsku analizu - LC/DAD/ESI-MSⁿ, utvrdili su dominantni udio fenolnih kiselina, feniletanoidnih glikozida i flavonoida.

Feniletanoidni glikozidi (engl. *Phenylethanoid glycosides*, PhG), identificirani u *Teucrium* spp., sadrže hidroksifeniletalni dio (C6-C2 struktura) na koji je molekula šećera, uglavnom β-glukopiranoza, vezana glikozidnom vezom, dok su dodatni monosaharidi (tj. ramnoza, apioza, galaktoza, ksiloza, itd.) i fenilpropanoidni (C6-C3) ostaci obično vezani za glukozni centar molekule (slika 2). Kao sinonimi umjesto PhG često se koriste nazivi glikozidni esteri kafeinske kiseline ili kafeoil feniletanoidni glikozidi jer je kafeinska kiselina najčešći fenilpropanoidni ostatak u PhG.

Ovi spojevi su higroskopni, topivi u metanolu, etanolu, vodi te drugim otapalima veće polarnosti, lako se oksidiraju, osjetljivi su na jako svjetlo, a njihove se glikozidne veze lako hidroliziraju pod djelovanjem enzima (Tian i sur., 2021). Feniletanoidni glikozidi do sada pronađeni u vrsti *T. montanum* su verbaskozid, ceruleskenozid, ehinakozid, kastanozid A, forsitozid B, samiozid itd. (Stanković, 2020). Ehinakozid (engl. *Echinacoside*, EHI) je reprezentativni PhG u biljnom svijetu prvi puta izoliran iz *Echinacea angustifolia* DC. EHI pokazuje različite farmakološke učinke prvenstveno neuroprotektivni, ali i kardioaktivni, protuupalni, antioksidacijski i anti-osteoporotični. Neuroprotektivno djelovanje povezano je s aktivacijom enzimskih puteva u neuronima pri čemu EHI može inhibirati otpuštanje citokroma c te na taj način zaštititi od oštećenja neurotoksičnog rotenona. Slična djelovanja pokazuje i verbaskozid prisutan u travi ivi. Verbaskozid (engl. *Verbascoside*, VERB) je široko rasprostranjen PhG u biljnom svijetu koji

je prvi puta izoliran 1963. godine iz divizme (*Verbascum sinuatum* L.) U dosadašnjim *in vitro* istraživanjima VERB pokazuje dobre neuroprotektivne učinke kroz kolinergičke, antioksidacijske i protupalne mehanizme uz dobar potencijal u liječenju raznih kožnih oboljenja (Alipieva i sur., 2014).



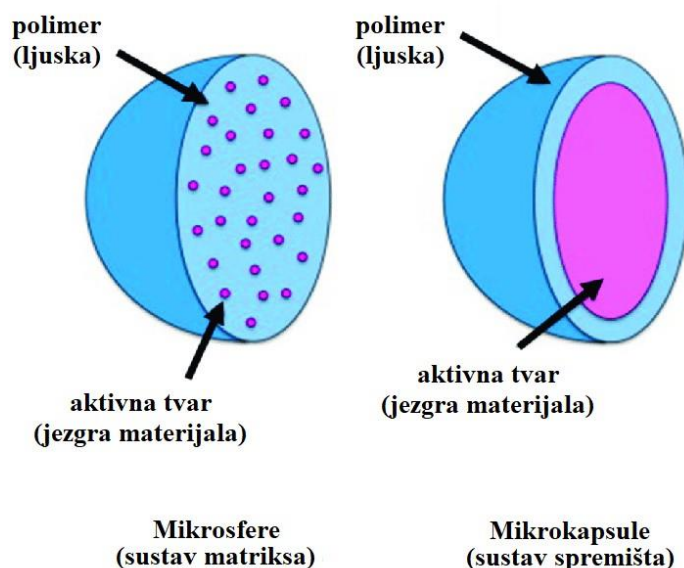
Slika 2. Osnovna struktura feniletanoidnih glikozida (prema Tu i sur., 2005)

PhG imaju širok raspon kemijskih, bioloških i fizioloških aktivnosti. Sposobnošću hvatanja slobodnih radikala te zaštitom DNA od oksidacijskog oštećenja, PhG pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost, ali inhibitornim učincima na *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* imaju i antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Neuroprotektivno djelovanje povezano je sa zaštitom živčanih stanica, a PhG su također uključeni u zaštitu jetre i poboljšanje pamćenja. Huang i sur. (2022) su obrazložili nisku bioraspoloživost PhG slabom oralnom apsorpcijom, brzim metabolizmom i brzom eliminacijom iz organizma zbog čega se teško može postići određena koncentracija PhG-a u krvi. Sukladno navedenome, autori predlažu primjenu inkapsulacijskih tehnika kojima bi se značajno povećala stabilnost i bioraspoloživost PhG-a te bi se izbjegli štetni učinci iz vanjskog okruženja. Također inkapsulacija omogućava ciljani transport i postepeno oslobađanje PhG-a što rezultira učinkovitijim terapijskim učincima.

2.3. INKAPSULACIJA

Inkapsulacija se definira kao postupak pakiranja jedne tvari unutar druge tvari, čime se proizvode čestice promjera od nekoliko mm do nekoliko nm. Tvar koja je inkapsulirana može se nazvati materijalom jezgre, aktivnom tvari i punjenjem, unutarnjom fazom ili fazom nosivosti. Tvar unutar koje se inkapsulira može se nazvati premazom, membranom, ljuskom, nosačem, stijenkom materijala, vanjskom fazom ili matriksom. Nosači inkapsulata koji se koriste u prehrambenim proizvodima ili procesima trebaju biti kemijski inertni i sposobni stvoriti barijeru između aktivne tvari i njezine okoline (Zuidam i Shimoni, 2010).

Dvije glavne vrste inkapsulata su sustav spremišta i sustav matriksa. Ako se oko aktivne tvari nalazi omotač onda je to sustav spremišta, dok je kod matriksa aktivna tvar jednoliko raspoređena po cijelom volumenu nosača (polimera) (slika 3).



Slika 3. Dvije glavne vrste inkapsulata: sustav spremišta (desno) i matriksa (lijevo) (prema Paulo i Santos, 2017)

Zrno, ptičja jaja ili stanice u membranama primjeri su „prirodne“ inkapsulacije koja štiti unutrašnjost materijala, produljuje i olakšava proces skladištenja ili transporta, te na kraju štiti sadržaj od vanjskog okruženja (Kłosowska i sur., 2023). Tehnološke prednosti koje se postižu inkapsuliranjem u prehrambenoj industriji su: zaštita aktivne tvari od kemijske degradacije (uzrokovanom oksidacijom ili hidrolizom) ili reakcije s drugim komponentama u proizvodu, smanjeno isparavanje hlapivih spojeva (npr. komponente arome) u vanjsku okolinu što je poželjno kod termički obrađenih prehrambenih proizvoda, veća stabilnost tijekom prerade, skladištenja i konzumacije, maskiranje nepoželjnog okusa, kontrolirano oslobađanje aktivne tvari tijekom vremena ili u određenom trenutku te podesiva svojstva aktivnih komponenata tj. izvornog materijala (veličina čestica, struktura, topiva u ulju ili vodi, boja ili npr. pretvaranje tekućeg aktivnog sredstva u prah). S druge strane visoka cijena, kompleksnost procesa inkapsulacije, izazovi u stabilnosti kapsule tijekom procesa i skladištenja prehrambenog proizvoda, ali i neprivačnost od strane potrošača negativne su strane inkapsulacije.

Danas su dostupne brojne tehnike inkapsulacije prehrambenih komponenti te odabir tehnike ovisi o vrsti i karakteristikama aktivne tvari, nosača (molekulska masa, polaritet, topljivost, raspodjela veličine čestice i veličine čestica, strukturne morfologije itd.), kao i o

željenoj kvaliteti i karakteristikama inkapsulata. Inkapsulacijska tehnika mora biti u stanju razviti sustav inkapsulacije koji omogućuje visok kapacitet punjenja, visoku učinkovitost inkapsulacije, stabilnost inkapsulacijskog sustava s dugim rokom trajanja, biokompatibilnosti te potrebne karakteristike otpuštanja i bioraspoloživosti aktivnog spoja.

S obzirom na transformacije koje se događaju tijekom formiranja inkapsulata inkapsulacijske tehnike dijele se na:

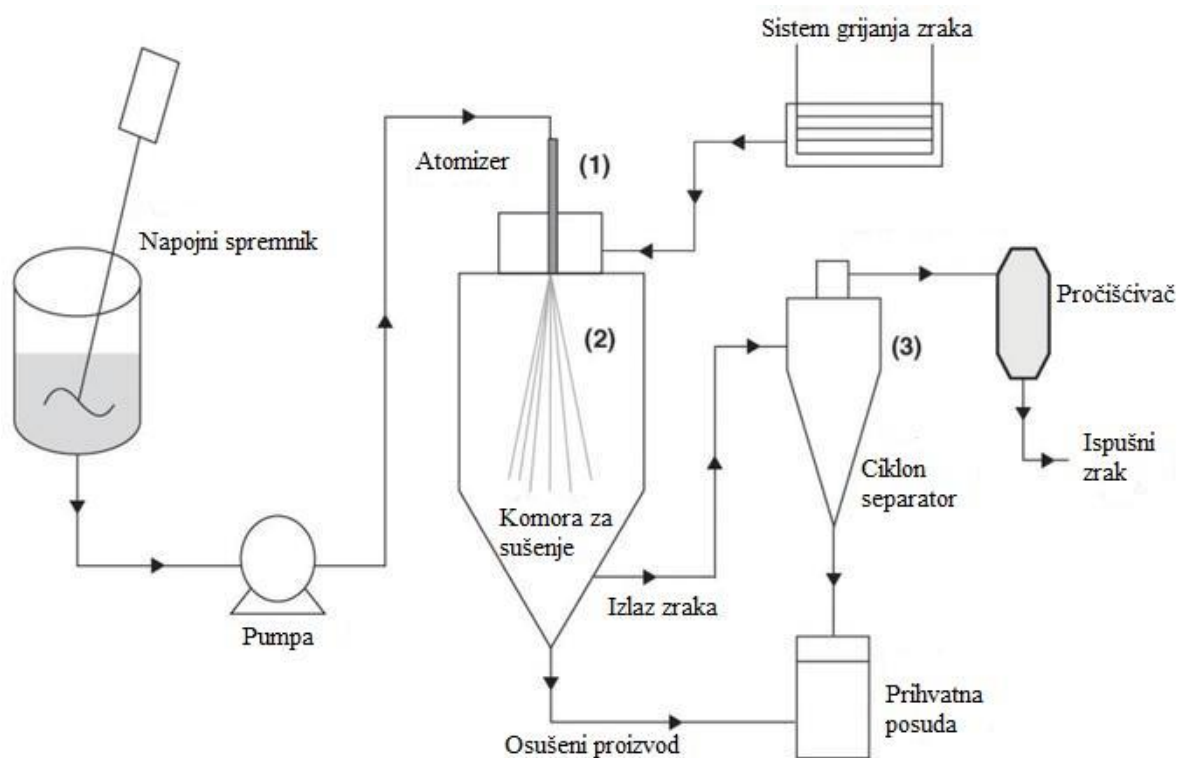
1. Kemijske (međufazna polimerizacija, emulzijska polimerizacija, *in situ* polimerizacija)
2. Fizikalno-kemijske (geliranje i koacervacija, liposomalna inkapsulacija)
3. Fizikalno/mehaničke/toplinske (premazivanje, atomizacija, istiskivanje i toplinske)
4. Elektrohodinamičke (elektroispredanje, elektroraspršivanje)

2.3.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je fizikalno-kemijska tehnika prvi puta korištena sredinom 19. stoljeća, točnije 1865. godine, kada je patentiran proces sušenja jaja. 1920-ih godina zabilježene su primjene ove tehnike na industrijskim razinama pri proizvodnji praška za pranje rublja i mlijeka. Od tada se ova tehnika primjenjuje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji.

Glavni princip sušenja raspršivanjem je dehidracija otopine u kontaktu s vrućim zrakom. Polimerna otopina nosača s aktivnim supstancama raspršuje se mlaznicom ili rotirajućim kotačem u vrućoj komori gdje dolazi do brzog isparavanja vode pod strujom vrućeg zraka. Suhe čestice sakupljaju se preko ciklona u prihvatnu posudu. Dobivene čestice su sferične s promjerima u rasponu od 10-100 μm . Uređaj za sušenje raspršivanjem uključuje: 1) sustav raspršivanja polimerne otopine; 2) sustav grijanja i regulacije temperature zraka za sušenje; 3) sustav pumpanja i kontrole protoka unosa polimerne otopine koji se suši; 4) sustav dovoda zraka za sušenje; 5) komora za sušenje i 6) sustav odvajanja zrak-osušeni prah (Silveira i sur., 2013).

Proces se može opisati kroz tri glavne faze: atomizacija, pretvorba kapljica u čestice i sakupljanje čestica (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz mehanizma za sušenje raspršivanjem. (1) Atomizacija. (2) Pretvorba kapljica u česticu. (3) Sakupljanje čestica (Santos i sur., 2017)

Proces sušenja raspršivanjem započinje pumpanjem otopine s aktivnom tvari i nosačem u raspršivač u kojem se raspršuje u obliku malih kapljica (sprej) zbog smanjenja površinske napetosti. Fizikalni princip na kojem se temelji atomizacija je fenomen raspada tekućine. Proces raspršivanja postiže se pritiskom, centrifugalnom, elektrostatičkom ili ultrazvučnom energijom koristeći posebne uređaje- raspršivače. Ovisno o željenim karakteristikama proizvoda (oblik, struktura i veličina), ali i o karakteristikama otopine za sušenje raspršivanjem, koriste se različiti raspršivači (rotacijski, raspršivači hidrauličkih mlaznica, s pneumatskim mlaznicama). Najčešće se koristi pneumatska mlaznica ili mlaznica za više tekućina gdje se dvije faze uvode u mlaznicu, otopina sirovine i komprimirani plinoviti medij za raspršivanje. Nakon atomizacije slijedi faza pretvorbe kapljica u čestice što uključuje kontakt raspršivača i zraka i sušenje kapljica. Izlaganjem kapljica vrućem plinu (uglavnom atmosferski zrak) u komori za sušenje dolazi do brzog isparavanja i kondenzacije otopljene tvari što rezultira uklanjanjem otapala. Na ovaj način kapljice tekućine pretvaraju se u krute čestice. Čestice praha sakupljaju se u ciklonskom separatoru ili drugom sustavu za sakupljanje praha. Osušene čestice u struji zraka dovode se u ciklon na vrhu, točnije

tangencijalno na cijev gdje strujnica slijedi silazni tok, stvarajući vanjski vrtlog. Velika brzina vanjskog vrtloga stvara centrifugalnu silu na česticu što omogućuje razdvajanje struje čestica i zraka. Dolaskom vrućeg zraka do stošca na dnu unutarnjim vrtlogom se vraća na vrh, izlazi iz ciklona kroz aspirator te se filtrira dok se čestice sakupljaju u sabirnoj posudi.

Na kvalitetu sušenja raspršivanjem utječu tip i veličina mlaznice za raspršivanje, uvjeti rada poput brzine rotacije diska raspršivača, temperatura zraka pri ulasku u komoru za sušenje, protok otopine koja se raspršuje, svojstva materijala koji se raspršuje, jačina aspiracije, kapacitet ciklona za odvajanje finih čestica i drugi. Sve to može utjecati nepoželjnim pojavama poput nakupljanja proizvoda po stjenkama opreme, neujednačenosti veličine čestica, termodegradacije konačnog proizvoda, povećani udio zaostale vode. Kao bitan parametar koji utječe na svojstva konačnog proizvoda tj. na udio zaostale vode u njemu je temperatura ulaznog zraka (150-220 °C) za sušenje koja mora biti ista temperaturi pri kojoj će raspršena tekućina isparavati vodu. Kao što se moglo primijetiti, na konačna svojstva osušenih proizvoda izravno utječe skup parametara opreme, procesnih parametara, ali i specifičnosti sirovine. Sve navedeno igra ključnu ulogu u konačnim karakteristikama čestica, dajući različite morfologije, veličine ili udjele preostale vode (Santos i sur., 2017; Zuidam i Shimoni, 2010)

Glavne prednosti ove tehnike su laka primjena u laboratorijskim i industrijskim uvjetima zbog brzine, kontinuiranosti i ponovljivosti procesa te uspoređujući s drugim procesima kraćeg je trajanja i prihvatljivije je cijene. Još jedna značajna prednost je mogućnost sušenja širokog spektra spojeva bez značajne termičke degradacije. Također dobiveni prahovi su boljih svojstva tečenja od konvencionalnih formulacija. Kao glavni izazov sušenja raspršivanjem je prinos koji je u laboratorijskim razmjerima i dalje od 20-70 % što je povezano s prethodno spomenutim gubicima tijekom procesa. U industrijskim uvjetima postavljeni su separatori (npr. filterski sustavi) kao rješenje smanjenju prinosa (Sosnik i Seremeta, 2015).

2.3.2. Nosači za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem

Nosači igraju ključnu ulogu u razvoju mikro-/nanokapsula za zaštitu bioaktivnih spojeva od vanjskih čimbenika (Vijeth i sur., 2019). Proces inkapsulacije i vrsta polimera imaju izravan utjecaj na razvoj bioaktivnih mikro-/nanokapsula što se uvelike odražava na veličinu kapljica emulzije, udio vode, iskorištenje, učinkovitost inkapsulacije, prividnu morfologiju, raspodjelu veličine čestica, nasipnu gustoću, topljivost, stabilnost, površinsku propusnost,

profil otpuštanja željenih bioaktivnih spojeva i druga fizikalna i kemijska svojstva (Lu i sur., 2021; Vijeth i sur., 2019). Stupanj prinosa i učinkovitosti inkapsulacije važne su reference potvrde prikladnosti nosača za inkapsulaciju, što može odražavati stupanj ugradnje materijala jezgre i kvalitetu proizvoda. Idealni nosači trebali bi imati visoku topljivost, nisku higroskopsnost, učinkovito emulgiranje, sposobnost maskiranja okusa, dobro stvaranje filma te bi trebali biti jeftini. Koncentrirane otopine nosača moraju imati relativno nisku viskoznost za atomizaciju i trebale bi moći zaštititi materijal jezgre od propadanja (Lu i sur., 2021). Može se koristiti samo jedna vrsta nosača (ugljikohidrati, proteini ili hidrofilne gume) ili kombinacija nosača. Primjeri često korištenih nosača su prirodne gume (arapska guma, alginati, karagenani i dr.), proteini (mliječni proteini, proteini soje, želatina i dr.), ugljikohidrati (maltodekstrin i derivati celuloze) i/ili lipidi (voskovi, emulgatori).

Arapska guma (AG) je biopolimer koji se sastoji od D-glukuronske kiseline, L-raminoze, D-galaktoze i L-arabinoze s 2 % udjela pridruženih proteina. Karakterizira ju visoka topljivost u vodi, niska viskoznost, visoka temperatura staklastog prijelaza, dobra kompatibilnost s drugim biljnim hidrokolidima, proteinima, ugljikohidratima ili modificiranim škrobovima. Coimbra i sur. (2021) u svom istraživanju navode kako su inkapsulati izrađeni od arapske gume sušenjem raspršivanjem stabilni pri niskom aktivitetu vode te kako kombinacija s proteinima djeluje stabilizirajuće i emulgirajuće no, ističu kako razgranatost strukture arapske gume može djelovati kao polupropusna membrana za kisik čime se smanjuje oksidacijska stabilnost inkapsulata.

Guar guma (GG) je poligalaktomanan dobiven iz zrna guara (*Cyamopsis tetragonoloba*) koji se sastoji od linearno 1,4 povezanih β -D-manopiranozilnih jedinica s pojedinačnim α -D-galaktopiranozilnim jedinicama povezanih 1,6 vezama kao bočnim granama na svakom drugom glavnom lancu. Udio galaktoze u guar gumi kreće se od 33-40 %. Guar guma je potpuno topiv u vodi na sobnoj temperaturi te pri niskim udjelima daje vrlo visoku viskoznost vodenim otopinama što je čini manje prikladnom za sušenje raspršivanjem. Kako bi se osigurala bolja učinkovitost inkapsulacije sušenjem raspršivanjem i poboljšala svojstva guar gume Tripathi i sur. (2022) razvili su zračenjem depolimeriziran GG koji je metiliran. Modificirani derivat GG je imao manju viskoznost, povećanu hidrofobnost zbog metilacije, bolju toplinsku stabilnost i pokazao je bolje zadržavanje aromatskih spojeva tijekom skladištenja od same arapske gume.

Karboksimetil celuloza (engl. *Carboxymethyl cellulose*, CMC) je derivat celuloze topiv u vodi koji sadrži karboksimetilne skupine ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) vezane na hidroksilne skupine

monomera glukopiranoze koji su supstituirani eterifikacijom ili karboksimetilacijom celuloze, obično na $C2 > C6 > C3$ (Tezuka i sur., 1996). Rafinirane ili fine čestice CMC koriste se kao dodaci prehrani, a sirovi oblici CMC koriste se za neprehrambene svrhe u velikim količinama. Karakterizira ga topljivost u hladnoj i toploj vodi, smanjenje viskoznosti zagrijavanjem. Pri niskoj ionskoj jakosti, niskoj koncentraciji i visokom pH polimerni lanci su najizduženiji što je pogodno za bolje umrežavanje, a samim time i poboljšanu zaštitu bioaktivnih spojeva.

Karagenan je visokomolarni sulfatni polisaharid koji nakon ekstrakcije i izolacije iz crvenih morskih algi kao što su *Kappaphycus* i *Eucheuma* komercijalno je dostupan u tri oblika: κ - (kappa), ι - (iota) i λ - (lambda). Strukturnu raznolikost pokazuje zbog stupnja sulfitiranja. Ovisno o vrsti stvaraju viskozne otopine i toplinski reverzibilne gelove s teksturom od mekane i elastične do čvrste i lomljive. Pokazuje sinergistički učinak u kombinaciji s drugim gumama. Prema Díaz-Montes (2023) i Marín-Peñalvera i sur. (2021) na učinkovitost inkapsulacije karagenana utječe vrsta komponente koju inkapsulira, na primjer interakcija karagenana i lipida je vrlo loša što rezultira nepotpunom homogenizacijom i komponentama koje ostaju van kapsula.

Hidrolizirani kolagen (HC) je proteinski derivat dobiven iz kolagena koji se nalazi u životinjskoj koži i kostima te ga karakterizira bezbojnost, dobra svojstva emulgiranja i stabilizacije, stvaranja filma kao i povećanje topljivosti inkapsuliranog proizvoda. Vargas-Muñoz i Kurozawa (2020) su za inkapsulaciju pulpe kokone (*Solanum sessiliflorum* Dunal) koristili kombinaciju maltodekstrina i hidroliziranog kolagena pri čemu je hidrolizirani kolagen smanjio gubitke proizvoda u komori za sušenje te ističu kako je njegovo dodavanje korisno za ljudsko zdravlje.

2.4. BOMBONSKI PROIZVODI

Bombonski i srodni proizvodi su konditorski proizvodi dobiveni odgovarajućim tehnološkim postupcima od šećera, drugih sirovina, aditiva i tvari koje se dodaju radi povećanja biološke vrijednosti proizvoda (Pravilnik, 2005; Goldoni, 2004).

Prema istraživanjima tržišta Data Bridge očekuje se da tržište bombona u razdoblju od 2022. do 2029. rasti uz prosječnu godišnju stopu od 3,94 %. Inovacije proizvoda ključan su trend koji pridonosi popularnosti konditorskih proizvoda među svim dobnim skupinama. U tom pogledu, a uzimajući u obzir i potencijalne zdravstvene rizike, konditorska industrija

veliku pozornost pridaje formulacijama proizvoda vodeći računa o prirodnom podrijetlu sastojaka, udjelu šećera i primjeni zamjenskih sladila te obogaćivanju proizvoda bioaktivnim sastojcima.

2.4.1. Gumeni bomboni

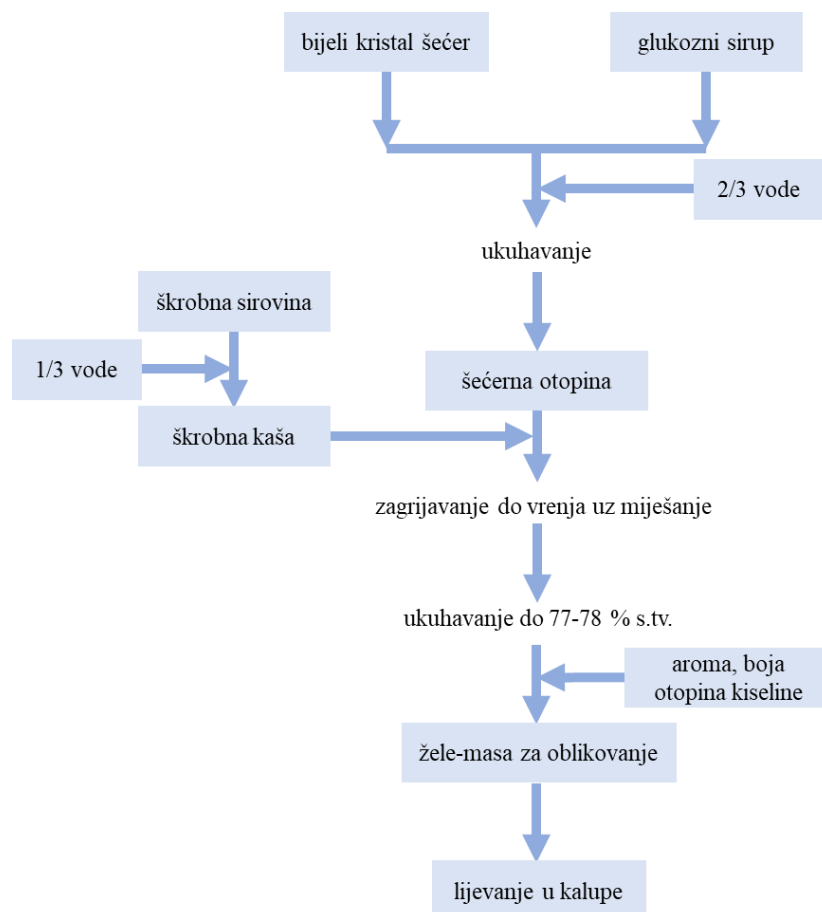
Gumeni bomboni su prehrambeni proizvodi čiji su glavni sastojci sredstva za želiranje (želatina, škrob, gume i pektin), sladila (saharoza, glukoza, kukuruzni sirupi), kiseline, arome i prehrambeni pigmenti (Gok i sur., 2020).

Zbog pogodnog matriksa koji omogućuje ugradnju različitih sastojaka, sve veća je potražnja za gumenim bombonima što dovodi do rasta industrije gumenih bombona i razvoja novih proizvoda. Potrošači sve više preferiraju „zdravije“ gumene bombone smanjenog udjela šećera, veganskim komponentama, dodatkom vitamina, biljnih komponenti poput fenolnih spojeva i dr. Zato se danas u proizvodnji gumenih bombona sve više okreću korištenju šećernih alternativa, prirodnih okusa i boja, bioaktivnih komponenata, supstituenata želatine i ostalih funkcionalni sastojaka. Iako se tradicionalno kao sredstvo za želiranje koristi želatina i derivati kolagena iz različitih izvora životinjskog porijekla unatoč brojnim benefitima, oni postaju sve neprikladniji zbog velike potražnje za veganskim, halal i košer certificiranim prehrambenim proizvodima. Postoje brojne zamjene za želatinu poput škrobova, pektina, agara, karagenana i drugih. Tarahi i sur. (2023) proizveli su zdravije gumene bombone s različitim koncentracijama praha Jaban lubenice, limunske kiseline i agar gume kao supstituenta želatine. Danas se istražuju brojne inovativne mogućnosti zamjene želatine što bi omogućilo proizvodnju novih i funkcionalnih bombona. Waraczewski i sur. (2022) navode kako se u gumenim bombonima može koristiti hidrokolid biljnog porijekla, nativni kuzu škrob, koji bi uz umrežavanje pomoću natrijevog trimetafosfata imao veću toplinsku stabilnost, stabilnost na smrzavanje-odmrzavanje i retrogradivnu stabilnost te veću viskoznost.

Goldoni (2004) navodi kako postoje dva načina proizvodnje gumenih bombona sa škrobom: u otvorenim kotlovima pri atmosferskom tlaku i u kontinuiranim uređajima pod tlakom. U otvorenim kotlovima pri atmosferskim tlakom žele-masa za gumene bombone priprema se na način da se u otvorenom kotlu, s neizravnim zagrijavanjem parom preko plašta kotla, kuha šećer i glukoza sirup u dvije trećine vode po recepturi, a s preostalom količinom vode pripremi se škrobna kaša. Pripremljena škrobna kaša se postupno doda u ukuhanu šećernu smjesu te se kuhanje nastavlja do postizanja željene konzistencije. Cilj je postići najmanje 78 % suhe tvari s količinom topljivih sastojaka ne manjom od 70 %. Po

završetku se dodaje boja, aroma i kiselina. Gotova žele-masa lijeva se u škrobom obložene kalupe te se nakon što proizvodi očvrstnu vade i suše. Kuhanje u kontinuiranom uređaju pod tlakom moguće je neizravnim ili izravnim zagrijavanjem. Neizravno je upotrebom crijevnog izmjenjivača topline s brisanom površinom gdje para visokog tlaka izvana zagrijava metalni tubus u kojem se nalazi suspenzija škroba i šećerne sirovine u vodi. Izravno zagrijavanje smjese podrazumijeva injektiranje suho zasićene pare pomoću radijalno postavljenih sapnica. Upotrebom kontinuiranih uređaja koristi se znatno manja količina vode jer ispari 1-2 % ukupne količine vode iz sirove smjese sastojaka, nema opasnosti od posmeđivanja žele-mase pri visokim temperaturama i moguće je korištenje visokoamiloznih škrobova. Shematski prikaz izrade žele-mase sa škrobom za proizvodnju gumenih bombona prikazan je na slici 5.

Ograničenja kod gumenih bombona sa škrobom je podložnost promijeni konzistencije zbog retrogradacije škroba pri čemu se povećava i žilavosti proizvoda. Drugi problem je i sklonost sinerazi ili likvefaciji s izdvajanjem sirupa iz proizvoda.



Slika 5. Shematski prikaz izrade žele-mase sa škrobom za proizvodnju gumenih bombona

Također, provedena su brojna istraživanja u svrhu razvoja funkcionalnih gumenih bombona dodatkom biljnih ekstrakata s ciljem proizvodnje bombona obogaćenih

antioksidansima iz ružmarina, lista guave, hibiskusa, bijelog čaja, đumbira, paprene metvice, propolisa, aronije i lista maslačka (Cedeño-Pinos, 2023). Cedeño-Pinos i sur. (2020) formulirali su gumene bombone s polifenolnim vodenim ekstraktom lista ružmarina na bazi fruktooligosaharida, inulina i stevije identificirajući značajan udio ružmarinske kiseline. Slijedećim istraživanjem, Cedeño-Pinos i sur. (2021) razvili su gumene bombone s ekstraktom zelenog propolisa, također bogatog polifenolnim spojevima uz artemillin-C, kao najznačajni sastojak. U oba istraživanja bilježe gorak okus, podrijetlom od polifenolnog ekstrakata, što predstavlja njihov ograničavajući faktor u proizvodnji gumenih bombona. Tijekom 4 mjeseca skladištenja Šeremet i sur. (2020) određivali su stabilnost veganskih gumenih bombona na bazi bijelog čaja koristeći šećerne alternative (steviolne glikozide, sorbitol i agavin sirup), hidrokoloide (agar i pectin kao zamjenu za želatinu) i prehrambena vlakna (inulin i psilijum). Dodatkom prirodnog izvora bioaktivnih komponenata, ekstrakt bijelog čaja obogatio je bombone i metilksantinom, kafeinom. Prema rezultatima, najdulji rok trajanja pokazali su bomboni s pektinom, kao i najveći udio suhe tvari, u odnosu na bombone s agarom koji su bili manje stabilni i podložniji kvarenju. Ghendov-Mosanu i sur. (2020) proučavajući učinke različitih koncentracija ekstrakta aronije, kao zamjene za sintetsku boju karmoizin u gumenim bombonima zaključuju kako je polifenolni ekstrakt aronije prikladna zamjena zbog poboljšanih antioksidacijskih i senzorskih svojstva bombona. Kako bi razvili niskokalorične gumene bombone, Gok i sur. (2020) glukozni sirup zamijenili su maltitonom sirupom uz praćenje učinka saharoze, manitola i topivih pšeničnih vlakana na fizikalno-kemijska, teksturalna i senzorska svojstva bombona. S obzirom na rezultate, zaključuju kako se kombinacijom saharoze i topivih pšeničnih vlakana mogu dobiti gumeni bomboni zadovoljavajućih karakteristika za potrošače, u odnosu na manitol čijom su primjenom zabilježeni lošiji senzorski rezultati.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljni materijal

U ovom istraživanju korišteni su nadzemni dijelovi trave ive (*Teucrium montanum* L.) sakupljene u ljetu 2021. godine na području općine Kistanje (Šibensko-kninska županija) od strane iskusnih sakupljača. Nadzemni dijelovi su pažljivo sortirani, očišćeni od svih stranih primjesa i osušeni na suhom i prozračnom mjestu. Tako osušeni biljni materijal je usitnjen (električni mlinac United Favour Development, Kowloon, Hong Kong) i prosijan kroz metalno sito veličine pora 450 μm , a frakcija < 450 μm je izdvojena i korištena kao ishodišni materijal za eksperimentalne analize.

3.1.2. Materijali korišteni za proizvodnju funkcionalnih gumenih bombona

- Kukuruzni škrob, Dr. Oetker (Jánossomorja, Mađarska)
- Kuzu škrob, Clearspring Organic Japanese Kuzu (London, Velika Britanija)
- Glukozni sirup (DE= 42), Fractal (Csömör, Mađarska)
- Tamna čokolada za proizvodnju pralina, Kraš (Zagreb, Hrvatska)
- Hladno prešano kokosovo ulje, Ekoplaza (Veghel, Nizozemska)
- Shea maslac, Agava Karin Lang (Bremen, Njemačka)
- Liofilizirane maline, Dennree (Töpen, Njemačka)
- Limunska kiselina, Šafram d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Glicerol, Gradska Ljekarna Zagreb (Zagreb, Hrvatska)
- Prirodna aroma maline, nabavljeno u Krašu (Zagreb, Hrvatska)
- Prirodno crveno bojilo, nabavljeno u Krašu (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Kemikalije

Sve korištene kemikalije i reagensi u eksperimentalnim analizama bili su visoke analitičke čistoće (*per analysis*, p.a.) ili HPLC čistoće.

Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem:

- Arapska guma, Alfa Aesar (Kandel, Njemačka)
- Hidrolizirana guar guma, nabavljeno u Krašu (Zagreb, Hrvatska)

- Karboksimetil celuloza, Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)
- Kolagen, Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)
- Kappa- karagenan, Gelymar (Puerto Montt, Čile)

Spektrofotometrijske metode:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Bezvodni natrijev karbonat, Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev hidroksid, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev molibdat, abcr GmbH (Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev nitrit, Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Sekundarni analitički standard ehinakozid (>98 %), Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)
- Sekundarni analitički standard verbaskozid (>98 %), Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)

Analiza vezanim sustavom tekućinske kromatografije spregnute sa tandemnom spektrometrijom masa korištenjem kvadripola i analizatora vremena leta (LC-Q-TOF-MS/MS)

- Mravlja kiselina, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD):

- Mravlja kiselina, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Analitički standard teobromin (min. 99 %), Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Analitički standard kafein, Fluka (Taufkirschen, Njemačka)
- Analitički standard ehinakozid (>98 %), Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)
- Analitički standard verbaskozid (>98 %), Biosynth s.r.o. (Bratislava, Slovačka)

In vitro gastrointestinalna digestija prahova i odabranog bombonskog proizvoda:

- Kalijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Magnezijev klorid heksahidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Amonijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev hidroksid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- humana salivarna α – amilaza, tip XIII-A (enzimske aktivnosti 1149 U/mg proteina), Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Pepsin podrijetlom iz želučane sluznice svinja, enzimske aktivnosti 474 U/mg, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Pankreatin podrijetlom iz svinjske gušterače, 4*USP, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)

Odmaščivanje bombonskih proizvoda i ekstrakcija polifenolnih komponenti

- Petroleter, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- 70%-tna otopina metanola, Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

3.1.4. Pribor i aparatura

- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, optičke kivete za spektrofotometar, (2 mL), filter papiri, špatulice, žlice, propipete, pribor za miješanje, silikonske špatule za miješanje
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (50 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete, lađice za vaganje
- Laboratorijsko stakleno posuđe: odmjerne tikvice, reagens Schott Duran boce s navojnim čepom, menzure, laboratorijske čaše, staklene epruvete, pipete, kristalizirke, lijevci, stakleni štapići, odmjerne tikvice
- Automatske mikropipete Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Laboratorijski živin termometar
- Digitalni termometar, Testo 108-2 (Titisee-Neustadt, Njemačka)
- Električni mlinac za usitnjavanje, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Vortex, Dlab Scientific (Schiltigheim, Francuska)
- Analitička vaga New Classic ML204/01, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Centrifuga SL 8R, Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Magnetska miješalica SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Rotacijski vakuum uparivač IKA RV8 (Staufen im Breisgau, Njemačka)

- Ultrazvučna kupelj S60H Elmasonic, Elma Schmidbauer (Singen, Njemačka)
- Spektrofotometar Genesys™ 10S UV-VIS, Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Goniometar, DataPhysics OCA 20 (Filderstadt, Njemačka)
- Sušionik, Instrumentaria d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator
- Kvarcni pijesak, Gram- Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijske posudice s poklopcima
- Analitički sakupljač frakcija Agilent 1100/1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- Spektrometar masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) spregnut s HPLC sustavom Agilent 1290 Infinity I, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- Kromatografska kolona Zorbax SB-C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Tekućinski kromatograf s vezanim detektorom s nizom dioda (DAD) Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Kromatografska kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 μm, 100 Å), Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- HPLC mikrofilteri od regenerirane celuloze (veličine pora 0,20 μm)
- HPLC viala za uzorke s navojnim čepovima, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Staklene viala za sakupljanje polifenolnih frakcija, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Volumetar, Engelsmann (Ludwigshafen, Njemačka)
- Uređaj za sušenje raspršivanjem, Büchi Mini Spray Dryer B- 290 (Flawil, Švicarska)
- Skenirajući elektronski mikroskop, TESCAN MIRA3 (Brno, Češka)
- Texture Analyzer TA.HD.plus, Stable Micro System (Velika Britanija)
- Električno kuhalo, Iskra (Ljubljana, Slovenija)
- Štoperica

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta trave ive

Vodeni ekstrakt trave ive pripremljen je konvencionalnom metodom ekstrakcije (100 °C, 1 g : 100 mL, 30 min) u laboratorijskoj boci s navojnim čepom. Nakon završene ekstrakcije, dobiveni ekstrakt je ohlađen, profiltriran kroz filter papir i uparen na rotacijskom vakuum uparivaču (IKA RV8, Staufen im Breisgau, Njemačka) do 1/10 početnog volumena. Tako koncentrirani ekstrakt je korišten za eksperimentalne analize i inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem.

3.2.2. Bioaktivna karakterizacija ekstrakta

3.2.2.1. *Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina (HC)*

Određivanje hidroksicimetnih kiselina bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom reakcijskog kompleksa ružičasto-crvenkastog obojenja nakon dodatka otopine natrijevog nitrita i natrijevog molibdata uz neutralizaciju natrijevom lužinom. Intenzitet obojenja reakcijske smjese određuje se mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Udio hidroksicimetnih kiselina se određuje tako da je u epruveti pomiješano: 0,5 mL uzorka, 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnov-og reagensa, 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine natrijevog hidroksida i 1,5 mL destilirane vode. Nakon homogenizacije na vorteksu (Dlab Scientific, Schiltigheim, Francuska) izmjerena je apsorbancija reakcijske smjese na 490 nm (GenesysTM 10S UV-VIS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD). Analiza je provedena u dvije paralelne probe za svaki uzorak. Paralelno je pripremljena slijepa proba koja je sadržavala sve reagense osim samog uzorka (umjesto uzorka pipetirana je destilirana voda).

Za izradu baždarne krivulje odabran je derivat kafeinske kiseline, ehinakozid, kao najzastupljeniji polifenolni spoj u ekstraktu. Udio hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje (formula 1).

$$y = 2,0983x - 0,0363 \quad [1]$$

gdje su:

x – udio ehinakozida (mg/mL)

y – izmjerena vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

Dobiveni rezultati izraženi su u g ekvivalenta EHI/100 mL ekstrakta (g ekv. EHI/100 mL ekstrakta).

3.2.2.2. *Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC)*

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa sa prisutnim reducirajućim spojem. Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfomolibdene i fosfovolframove kiseline koji reagira s fenoksid ionom pri čemu se fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenog molibdenovog i volframovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, spektrofotometrijski se izmjeri apsorbancija, tj. intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i 24 Amerine, 1988). Izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Za reakciju određivanja ukupnih polifenola u epruvetu otpipetirano je 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagens (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) i 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata te se sadržaj epruvete promiješa na vorteksu (Dlab Scientific, Schiltigheim, Francuska). Svaki uzorak analiziran je u dvije paralelne probe. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su u mraku na 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega je izmjerena apsorbancija na 765 nm (GenesysTM 10S UV-VIS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD). Slijepa proba se priprema na način da se umjesto uzorka otpipetira 100 µL destilirane vode.

Iz jednadžbe baždarne krivulje (formula 2), konstruirane za standard ehinakozida, izračunat je udio ukupnih polifenola.

$$y = 0,5316x - 0,0135 \quad [2]$$

gdje su:

x – udio ukupnih polifenola (mg/mL)

y – izmjerena vrijednost apsorbancije na 765 nm.

Dobiveni rezultati izraženi su u g ekvivalenta EHI/100 mL ekstrakta (g ekv. EHI/100 mL ekstrakta).

3.2.2.3. *Identifikacija nepoznatih polifenolnih komponenti primjenom LC-Q-TOF-MS/MS sustava*

Najprije su iz profiltriranog vodenog ekstrakta trave ive izolirane željene polifenolne frakcije prema retencijskom vremenu eluiranja, korištenjem HPLC-DAD-a spregnutog s analitičkim sakupljačem frakcija (Agilent 1100/1200 Series, Agilent, Santa Clara, USA). Razdvajanje komponenti izvršeno je na analitičkoj koloni Zorbax extend C-18 (250×4,5 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, USA) korištenjem gradijentne elucije: vodene faze A (1 % mravlje kiseline u vodi, v/v) i organske faze B (1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, v/v). Protok mobilnih faza iznosio je 1 mL/min pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Duljina trajanja metode iznosila je 52 min uz dodatnih 10 min ekvilibracije na početne uvjete metode. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 5 µL. Sakupljenim polifenolnim frakcijama uklonjena je mobilna faza na rotacijskom uparivaču, a suhi ostatak svake frakcije je resuspendiran u 80%-tnom acetonitrilu.

Izolirane polifenolne frakcije identificirane su primjenom spektrometra masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) spregnutog sa HPLC sustavom Agilent 1290 Infinity II. Kromatografsko odjeljivanje je provedeno na koloni Zorbax SB-C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm) pri temperaturi kolone od 40°C. Mobilna faza sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u vodi (A) i u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent mobilne faze je bio sljedeći: 0 min- 95% A faze, 0-15 min: 95-5 % A faze, 15-17 min: 5 % A faze. Protok mobilne faze je bio 0,2 mL/min, a injektirano je 2 µL uzorka.

Parametri HRMS analize postavljeni su na sljedeći način:

- Temperatura protočnog plina dušika (sheath gas): 350°C
- Protok protočnog plina: 11 L min/min
- Tlak raspršivača (nebulizer): 35 psi
- Potencijal kapilare (VCap): 3500 V
- Potencijal mlaznice (nozzle voltage): 1000 V
- Temperatura plina dušika za desolvaciju (drying gas): 200°C
- Protok plina za desolvaciju: 14 L/min
- Ionizacijska tehnika: ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u negativnom načinu

Identifikacija analiziranih polifenolnih komponenti provedena je usporedbom dobivenih podataka za molekularne ione i fragment-ione s literaturnim podacima i dostupnim online bazama podataka za identifikaciju spektara masa (Sci Finder). Rezultati HRMS analize za izdvojene spojeve prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati HRMS analize za izdvojene spojeve (engl. *High resolution spectrometry mass*)

Identificirana komponenta	Molekularna formula	Pogreška (ppm)	Teoretska masa (m/z)	Eksperimentalna masa (m/z)	MS/MS (m/z)
teupoliozid	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	-1,66	785,2509	785,2522	623,2189, 477,1609, 161,0241
stahizozid A	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	-8,08	755,2476	755,2415	623,1972, 593,2097, 461,1660, 315,1078, 161,0244
poliumozid	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	4,03	769,2550	769,2581	607,2240, 461,1649, 161,0244

3.2.2.4. Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

Ehinakozid, verbaskozid, teupoliozid (engl. *Teupolioside*, TEU), stahizozid A (engl. *Stachyoside A*, STAH A) i poliumozid (engl. *Poliumoside*, POLI) su feniletanoidni glikozidi za čiju je kvantifikaciju primijenjena metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) uz detektor s nizom fotodioda (engl. *Diode array detector*, DAD) (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Uzorci prije analize u kromatografskom sustavu razrijeđeni su u odgovarajućem omjeru i profiltrirani kroz mikrofiltre veličine pora 0.20 μm. Razdvajanje komponenti provedeno je na kromatografskoj koloni Agilent Series 1200 na Zorbax C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 μm, 100 Å) pri temperaturi kolone od 25 °C, protok od 1 mL/min i gradijentnu eluaciju- promjenu sastava mobilne faze tijekom analize između polarne vodene faze A (1 % mravlje kiseline u vodi, v/v) i organske faze B (1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, v/v) u definiranom vremenu: 0-5 min; 7 % B, 5-45 min; 7- 40 %, 45-52 min; 40-70 %. Volumen injektiranja iznosio je 5 μL profiltriranog uzorka. Identifikacija i kvantifikacija ehinakozida i verbaskozida provedena je pri maksimumu apsorpcije od 320 nm prema retencijskom

vremenu analitičkog standarda, uz korištenje jednadžbi baždarnih krivulja dobivenih iz prethodno izrađenih baždarnih krivulja za ehinakozid (formula 3) i verbaskozid (formula 4). Identifikacija poliumozida, teupoliozida i stahizozida A provedena je koristeći LC-Q-TOF-MS/MS tehniku, a iste komponente su kvantificirane preko standardnih baždarnih krivulja za ehinakozid.

Jednadžbe baždarnih krivulja standarda:

$$\text{a) Ehinakozida : } y = 5,4397x + 5,8523 \quad [3]$$

$$\text{b) Verbaskozida: } y = 7,2350x - 3,7707 \quad [4]$$

Dobiveni rezultati izraženi su u g EHI/100 mL ekstrakta (g EHI/100 mL ekstrakta) odnosno u g ekvivalenta EHI/100 mL ekstrakta (g ekv. EHI/100 mL ekstrakta).

3.2.3. Priprema polimernih otopina ekstrakta

Polimerne otopine su pripravljene vaganjem (tehnička vaga A&D Instruments, Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo) jednog (100 %) ili dva odabrana polimerna nosača u kombinaciji (75 % : 25 %), tako da je konačni maseni udio nosača u koncentriranom ekstraktu iznosio 4 % (w/w). Na ovaj način pripravljeno je 13 različitih otopina (tablica 2). Tako odvagane otopine homogenizirane su 24 sata na magnetnoj miješalici do potpunog otapanja (SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka).

Tablica 2. Kombinacija polimera s uparenim ekstraktom trave ive

Broj uzorka	Korišteni polimerni nosači	Oznaka uzorka
Uzorak 1	4 % arapska guma	AG
Uzorak 2	3 % arapska guma + 1 % kolagen	AG_K
Uzorak 3	3 % arapska guma + 1 % karagenan	AG_KAR
Uzorak 4	3 % arapska guma + 1 % CMC*	AG_CMC
Uzorak 5	4 % guar guma	GG
Uzorak 6	3 % guar guma + 1 % kolagen	GG_K
Uzorak 7	3 % guar guma + 1 % karagenan	GG_KAR

Tablica 2. Kombinacija polimera s uparenim ekstraktom trave ive – *nastavak*

Uzorak 8	3 % guar guma + 1 % CMC*	GG_CMC
Uzorak 9	0,8 % CMC*	CMC
Uzorak 10	0,6 % CMC*+ 0,2 % kolagen	CMC_ K
Uzorak 11	0,6 % CMC* + 0,2 % karagenan	CMC_ KAR
Uzorak 12	0,6 % CMC* + 0,2 % guar guma	CMC_GG
Uzorak 13	0,6 % CMC* + 0,2 % arapska guma	CMC _ AG

*CMC – karboksimetil celuloza

Sušenje raspršivanjem prethodno pripremljenih polimernih otopina provedeno je pomoću laboratorijskog uređaja Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Flawil, Švicarska). Početna (polimerna) otopina ekstrakta pumpa se peristaltičkom pumpom (15 % rada pumpe- za sve uzorke osim uzoraka 4 i 8, 4 % rada pumpe- za uzorke 4 i 8) kroz plastičnu cjevčicu i uvodi se u komoru za raspršivanje kroz sapnicu (150 µm za sve uzorke osim uzoraka 4 i 8; 600 µm za uzorke 4 i 8). Sušenje ulazne početne otopine postiže se atomizacijom struje tekućine u raspršene kapljice i njihovom disperzijom u zagrijanom zraku pri zadanoj temperaturi (150 °C za sve uzorke). Aspirator (100 %-tni rad) povlači raspršenu tekućinu te ju istovremeno pod centrifugalnom silom uvodi u ciklon, posljedično stvarajući osušeni prah. Prah se sakuplja u prihvatnoj posudi dok se zrak filtrira kroz politetrafluoretilenski (engl. *Polytetrafluoroethylene*, PTFE) filter.

3.2.3.1. *Određivanje prinosa procesa sušenja raspršivanjem*

Prinos procesa (PP) izračunat je kao omjer mase suhe tvari inkapsulata (g) dobivenog sušenjem raspršivanjem i mase suhe tvari polimerne otopine (g) uvedene u proces inkapsulacije (formula 5).

$$PP(\%) = \frac{\text{masa suhe tvari inkapsulata}}{\text{masa suhe tvari početne otopine}} * 100 \quad [5]$$

3.2.4. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika inkapsulata

3.2.4.1. *Određivanje udjela suhe tvari polimernih otopina i inkapsulata*

Udio suhe tvari određuje se prema standardnoj metodi AOAC 930.15 (1990) (AOAC, 1990) sušenjem u sušioniku (Instrumentaria d.d., Zagreb, Hrvatska) do konstantne mase na 105 °C pri čemu dolazi do izdvajanja slobodne vode iz uzorka.

U prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem odvagano je 1 g (s točnošću $\pm 0,0001$) uzorka nakon čega je uslijedilo sušenje u sušioniku nepokrivene aluminijske posudice s uzorkom 2 sata pri 105 °C. Po završetku sušenja, posudica se poklopi te se prebaci u eksikator gdje se hladi do sobne temperature i potom se važe na analitičkoj vagi. Ovaj postupak se ponavlja sve do postizanja konstantne mase (s točnošću $\pm 0,0003$ g). Za određivanje suhe tvari početnih otopina, uzorci su vagani u prethodno pripremljenoj aluminijskoj posudici s kvarcnim pijeskom.

Udio vode u uzorcima se dobiva prema formuli:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad [6]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

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

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

Prema dobivenom udjelu vode izračunat je i udio suhe tvari (formula 7).

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [7]$$

3.2.4.2. *Nasipna gustoća*

Prema modificiranoj metodi Murakamija i suradnika (2001) određena je nasipna gustoća. U prethodno odvagan prazni plastični cilindar volumena 250 mL usipan je uzorak te je zabilježena masa cilindra napunjenog uzorkom i očitani volumen koji je uzorak zauzeo. Nasipna gustoća („bulk density“) u g/cm^3 određena je kao omjer mase uzorka u cilindru i zauzetog volumena uzorka u cilindru (formula 8).

$$\text{Nasipna gustoća (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_{\text{uzorak (g)}}}{V_{\text{uzorak (cm}^3\text{)}} \quad [8]$$

Tako napunjeni plastični cilindar s uzorkom namješten je na volumetar (Engelsmann (Ludwigshafen, Njemačka) te je očitani volumen koji je uzorak zauzeo nakon 10 udaraca („loose density volumen“) i nakon 100 udaraca („tapped density volumen“). Iz dobivenih vrijednosti za volumene pri 10 i 100 udaraca te mase uzorka usipanog u plastični cilindar izračuna se „loose“ i „tapped“ gustoća (g/cm^3). Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

U cilju određivanja kompresibilnosti praškastih proizvoda, preko dobivenih vrijednosti za nasipnu gustoću izračunavaju se bezdimenzijske veličine Carr indeks kao svojstvo tečenja i Hausnerov omjer (HR) kao svojstvo kohezivnosti.

Za izračun ove dvije veličine potrebna je nasipna gustoća (ρ_{bulk}) i gustoća dobivena nakon 100 udaraca (ρ_{tapped}).

Carr indeks se izračunava prema slijedećoj formuli:

$$\text{Carr indeks} = \frac{(\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}})}{\rho_{\text{tapped}}} * 100 \quad [9]$$

Odnos Carr indeksa i svojstva tečenja određuje se prema tablici 3.

Tablica 3. Kategorizacija sposobnosti tečenja prahova prema Carr indeksu

Carr indeks	Tečenje
< 15	Vrlo dobro
15-20	Dobro
20-35	Dovoljno
35-45	Loše
>45	Vrlo loše

Hausnerov omjer izračunava se prema slijedećoj formuli:

$$\text{HR} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}} \quad [10]$$

U tablici 4 prema izračunatom Hausnerov-om omjeru uzorci se svrstavaju u kategorije kohezivnosti.

Tablica 4. Kategorizacija kohezivnosti prahova prema Hausnerovom omjeru (HR)

HR	Kohezivnost
< 1,2	Mala
1,2 – 1,4	Srednja
> 1,4	Velika

3.2.4.3. *Močivost*

Sposobnost močenja proizvedenih prahova ispitana je mjerenjem kontaktnog kuta odabrane kapljavine-vode sa ravnom, stlačenom površinom praha, a što je indikator hidrofilnosti odnosno hidrofobnosti testiranog materijala. Kontaktni kut mjeri se između dodirne površine otapala i krute tvari te tangente kapljice na granici čvrste, tekuće i plinovite faze.

Uređaj koji mjeri kontaktni kut zove se goniometar (u radu je korišten DataPhysics OCA 20), a sastoji se od izvora svjetlosti, kamere spojene na računalo te dijelova za pomicanje postolja, odnosno kamere. Prilikom pada kapi otapala na ravnu površinu praha, računalo pomoću softvera prikazuje realnu sliku pada kapljice, pri čemu je potrebno pravovaljano snimiti sam prikaz kontakta kapljice i materijala te dobivenu sliku obraditi koristeći odgovarajući alat (korištena je Sessile drop metoda). Koristeći Young-Laplace metodu, izračunata je srednja vrijednost izmjerenih kontaktnih kuteva.

3.2.5. Morfološka karakterizacija prahova skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)

Morfologija prahova određena je skenirajućom/pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) na mikroskopu TESCAN Mira3 (Brno, Češka). Uzorci su nanoseni na specijalizirane nosače te su prije mikroskopske analize impregnirani slojem zlata u cilju osiguranja električne provodljivosti. Skeniranje je provedeno primjenom napona od 10 kV. Dobivene slike snimane su pod povećanjem $\times 800$ i $\times 2000$.

3.2.6. Određivanje bioaktivne karakterizacije inkapsulata

3.2.6.1. *Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti i kapaciteta punjenja inkapsulata*

Inkapsulacijska učinkovitost i kapacitet punjenja dobivenih inkapsulata definirani su određivanjem udjela ukupnih polifenola, udjela hidroksicimetnih kiselina i određivanjem

udjela pojedinačnih komponenata HPLC metodom. Za izračun inkapsulacijske učinkovitosti, primjenjuje se:

$$IU (\%) = \frac{W_i}{W_u} * 100 \quad [11]$$

pri čemu je W_i udio komponenti od interesa u proizvedenom inkapsulatu, a W_u udio komponenti od interesa u ishodišnoj otopini pripremljenoj za inkapsulaciju.

Kapacitet punjenja (formula 12) za ukupne polifenole, hidroksicimetne kiseline i pojedinačne polifenolne spojeve izračunat je prema formuli:

$$KP (\%) = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad [12]$$

pri čemu je m_2 masa komponenti od interesa u inkapsulatu (g), m_1 ukupna masa izvaganog inkapsulata (g)

3.2.6.2. *Određivanje HC-a*

Metoda određivanja udjela hidroksicimetnih kiselina prisutnih u polimernim otopinama i inkapsulatima provedena je na jednak način kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.2.1. *Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina (engl. Hydroxycinnamic acid content, HC)* pri čemu su dobiveni rezultati izražavaju kao maseni postotak (%) prilikom izračuna i inkapsulacijske učinkovitosti (IU) i kapaciteta punjenja (KP).

3.2.6.3. *Određivanje TPC-a*

Određivanje ukupnih polifenola detaljno je opisano potpoglavlju 3.2.2.2. *Određivanje udjela ukupnih polifenola (engl. Total phenolic content, TPC)*, a dobiveni rezultati prilikom izračuna inkapsulacijske učinkovitosti (IU) i kapaciteta punjenja (KP) izražavaju se kao maseni postotak (%).

3.2.6.4. *Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida HPLC-DAD metodom*

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih feniletanoidnih glikozida provedena je na jednak način kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.2.4. *Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)*.

Dobiveni rezultati za pojedinačne feniletanoidne glikozide izražavaju se kao maseni postotak (%) prilikom izračuna inkapsulacijske učinkovitosti (IU) i kapaciteta punjenja (KP).

3.2.7. *In vitro* gastrointestinalna digestija

Metoda *in vitro* digestije inkapsulata i bombonskih uzoraka provedena je prema Brodkorb i sur. (2019).

Probava uključuje izlaganje hrane trima uzastopnim probavnim fazama: oralnoj, želučanoj i crijevnoj (Brodkorb i sur., 2019). U svrhu simulacije tih faza prvo su pripremljene puferne otopine odgovarajućih soli i pH vrijednosti za simulaciju oralne faze (engl. *Simulated salivary fluid*, SSF), želučane faze (engl. *Simulated gastric fluid*, SGF) i intestinalne faze (engl. *Simulated intestinal fluid*, SIF). Za analizu inkapsulata korištene su puferne otopine SGF i SIF. Za potpunu simulaciju želučane faze prvo je u SGF puferu otopinu izvagan pepsin na analitičkoj vagi (New Classic ML204/01, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska) (aktivnost enzima- 2000 U/mL na ukupni korišteni volumen pufera) . Kao bitni parametri tijekom analize su temperatura (strogo održavana na 37 °C mjerenjem pomoću laboratorijskog termometra) te homogeno miješanje na magnetnoj miješalici (SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka) pri 120 rpm-a. Simulacija želučane faze započinje otapanjem odvagane uzorka inkapsulata (0,2 g na analitičkoj vagi New Classic ML204/01, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska) u 35 mL SGF pufera s pepsinom. Nakon 5, 10, 15, 30, 60, 90 i 120 minuta provedeno je uzorkovanje (700 µL) za HC i TPC analizu otpuštenih polifenolnih spojeva, pri čemu je izdvojeni volumen zamijenjen s istim volumenom puferne otopine s enzimom. Usporedno je nakon svakog vremenskog perioda izuzet isti volumen SGF pufera + enzima bez uzorka za slijepu probu. Nakon 120 min, 35 mL SGF pufera s uzorkom pomiješano je s jednakim volumenom prethodno termostatiranog SIF pufera u kojem su izvagani i otopljeni enzim pankreatin (1 mg/mL) i žučne soli (2,5 mg/mL). Na isti način je pomiješana ista količina SGF pufera + enzima i SIF pufera + enzima za slijepu probu. Uzorkovanje je provedeno nakon 125, 130, 135, 150 i 180 minuta.

Nakon svih uzorkovanja izuzeti uzorci su analizirani TPC i HC metodom kako bi se odredio udio ukupnih polifenola i hidrosicimetne kiseline otpuštene u određenom trenutku tijekom analize *in vitro* digestije. Analiza se provodi na jednak način kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.2.1. i 3.2.2.2., a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta ehinakozida na g suhe tvari praha (mg ekv. EHI/g s.tv. praha)

3.2.8. Razvoj i analiza funkcionalnih gumenih bombona

3.2.8.1. *Priprema bombonskih receptura i punjenja*

Bombonske recepture pripravljene su u laboratorijskim uvjetima prema razvijenim recepturama. Najprije je pripremljen šećerni sirup ukuhavanjem 75 % saharoze i 25 % glukoznog sirupa u destiliranoj vodi na 125 °C na električnoj ploči za kuhanje (Iskra, Ljubljana, Slovenija). Tijekom ukuhavanja temperatura je strogo kontrolirana digitalnim termometrom (Testo 108-2, Titisee-Neustadt, Njemačka). Ukuhani šećerni sirup u obrocima se dodavao u prethodno želatiniziranu vodenu suspenziju kukuruznog (gustin) i kuzu škroba ili njihove kombinacije, uz konstantno miješanje smjesa silikonskom špatulom. Ukoliko je pripravljena receptura s kombinacijom škrobova, svaki škrob, ovisno o udjelu, je želatiniziran posebno zbog različitih vremena želatinizacije. Završetkom želatinizacije, škrobne suspenzije su združene i homogenizirane.

Smjesa škroba i šećernog sirupa zagrijavana je na srednje jakoj vatri, a kraj ukuhavanja smjese određen je vizualnom procjenom, odnosno uočavanjem karakterističnog razvlačenja bombonske smjese. Gotova bombonska smjesa ohlađena je nekoliko minuta, nakon čega je dodana prethodno otopljena smjesa limunske kiseline, arome maline, crvena boje, usitnjenog i prosijanog praha liofiliziranih malina (električni mlinac United Favour Development, Kowloon, Hong Kong) i glicerol u nekoliko kapi vode. Tekući sastojci arome, boje i otopljene limunske kiseline su dodani Pasteurovom pipetom. Formulirano je 5 receptura bombonskih smjesa s različitim kombinacijama škrobova što je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Recepture bombonskih smjesa

	100G	75G:25KZ	50G:50KZ	75KZ:25G	100KZ
Saharoza	75 g	75 g	75 g	75 g	75 g
Glukozni sirup	25 g	25 g	25 g	25 g	25 g
Voda	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g
Gustin	25 g	18,75 g	12,5 g	6,25 g	/
Kuzu škrob	/	6,25 g	12,5 g	18,75 g	25 g

Tablica 5. Recepture bombonskih smjesa – *nastavak*

Voda	125 g	125 g	125 g	125 g	125 g
Limunska kiselina	1,2 g	1,2 g	1,2 g	1,2 g	1,2 g
Aroma maline	3 kapi	3 kapi	3 kapi	3 kapi	3 kapi
Crvena boja	3 kapi	3 kapi	3 kapi	3 kapi	3 kapi
Liofilizirane maline	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Glicerol	20 kapi	20 kapi	20 kapi	20 kapi	20 kapi

100G-100 % gustin; 75G:25KZ-75 % gustin + 25 % kuzu; 50G:50KZ-50 % gustin + 50 % kuzu; 75KZ:25G-75 % kuzu + 25 % gustin; 100KZ-100 % kuzu

Za pripremu punjenja u prethodno pripremljenu smjesu ulja (1 : 4 = shea maslac : kokosovo ulje) dodano je 2,2 % inkapsulata (preračunato na ukupnu masu punjenja). Nakon homogenizacije, dodana je prethodno otopljena čokolada za praline. Omjer smjese ulja i čokolade u ukupnoj smjesi u konačnici je iznosio 20 % : 80 %.

Cilj je da se na bombonski plašt nanese 30 % punjenja nakon čega se bombon smota u obliku rolade i zamota u prozirnu foliju obloženu škrobom radi zadržavanja oblika.

3.2.8.2. *Određivanje udjela suhe tvari*

Udio suhe tvari pripremljenih bombona određen je prema AOAC 930.15 (1990) metodi opisanoj u potpoglavlju 3.2.4.1. *Određivanje udjela suhe tvari polimernih otopina i inkapsulata.*

3.2.8.3. *Odmašćivanje uzoraka*

Postupak odmašćivanja uzoraka proveden je prema Adamson i sur. (1999). Odvagano je 2 g bombona u Falcon epruvetu (50 mL) te je dodano 10 mL petroletera. Nakon ekstrakcije masne faze (10 min, 400 rpm na magnetnoj miješalici) (SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka) i centrifugiranja (10 min, 4 °C, 2500 rpm) (SL 8R, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD), dobiveni supernatant (masna faza) je oddekantiran. Postupak odmašćivanja taloga ponovljen je još dva puta dodatkom iste količine otapala.

3.2.8.4. *Ekstrakcija polifenolnih spojeva i metilksantina iz odmašćenih uzoraka*

U odmašćeni talog najprije je dodano 5 mL 70 % metanola (v/v). Ekstrakcija (30 min, 65 °C) je provedena u ultrazvučnoj kupelji (S60H Elmasonic, Elma Schmidbauer, Singen, Njemačka) nakon čega je izvršena dodatna homogenizacija na magnetskoj miješalici (SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka) (15 min, 400 rpm) i centrifugiranje (5000 rpm 10 min, 4 °C) (SL 8R, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD). Postupci ekstrakcije i centrifugiranja za svaki uzorak provedeni su ukupno tri puta, a supernatanti pojedinog uzorka su združeni u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeni 70 %-tnim (v/v) metanolom do oznake i centrifugiranja.

3.2.8.5. *Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida i metilksantina HPLC-DAD metodom*

Kako bi se identificirali i kvantificirali feniletanoidni glikozidi (ehinakozid, verbaskozid, teupoliozid, stahizozid A i poliumozid) i metilksantini (teobromin i kafein) prisutni u čokoladnom bombonskom punjenju, primijenjena je HPLC analiza. Analiza, ali i sama identifikacija i kvantifikacija feniletanoidnih glikozida je provedena na jednak način kao i za uzorke inkapsulata (potpoglavlje 3.2.2.4. *Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)*). Uz prisutne feniletanoidne glikozide, na kromatogramu su identificirani i teobromin i kafein pri maksimumu apsorpcije od 278 nm. Za njihovu kvantifikaciju korištene su baždarne krivulje standarda teobromina (formula 13) i kafeina (formula 14).

Jednadžbe baždarnih krivulja standarda:

$$\text{a) Teobromin: } y = 15,025x - 1,7844 \quad [13]$$

$$\text{b) Kafein: } y = 14,525x - 0,6509 \quad [14]$$

Dobiveni rezultati za feniletanoidne glikozide i metilksantine izraženi su kao mg pojedinačnog spoja (ehinakozida i verbaskozida) ili ekvivalenta ehinakozida po g suhe tvari bombona (mg/g s.tv. bombona).

3.2.8.6. *Teksturalna svojstva*

Teksturalna analiza provedena je na uređaju za mjerenje teksture (Texture Analyzer, TA.HD.plus, Stable Micro System, Velika Britanija) koji je povezan s računalom. Uzorak bombona stavi se na postolje te se na računalu podese radni parametri brzina, dubina i sila prodiranja. Za test penetracije, podešeni su parametri za: dolaznu brzinu (1 mm/s), brzinu

penetracije sonde (1 mm/s), izlaznu brzinu sonde (10 mm/s) i dubinu penetracije sonde (20 mm), s pragom osjetljivosti 5 g. Masa mjerne ćelije iznosila je 5 000 g. Nakon puštanja uređaja u pogon, sonda tlači uzorak, a mjerni osjetnik prati otpor koji se javlja u uzorku bombona uslijed prodiranja sonde kroz uzorak i upravljačkoj jedinici javlja radne parametre. Praćeni parametri su: sila probijanja površine uzorka (N) (tvrdoća), progib površine uzorka prije probijanja (mm) (elastičnost) i rad probijanja površine uzorka (Nmm). Analizirani su uzorci bombona s punjenjem i uzorci bombonskog plašta (bez punjenja) te je provedeno ispitivanje u 3 paralele.

3.2.8.7. *Senzorska analiza*

Pet različitih receptura bombona s punjenjem s inkapsulatom i bombona s punjenjem bez inkapsulata procijenjeni su senzorskom analizom pomoću internog panela od 10 članova Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Prema dostupnoj literaturi, definirana su senzorska svojstva teksture i okusa za ocjenjivanje. Svaki član panela dobio je po jedan uzorak svakog bombona s inkapsulatom na kojem su se ocjenjivali čvrstoća, adhezivnost, žvakljivost, konzistencija, slatkoća, gorčina, naknadni okus i opća prihvatljivost. Gorčina i naknadni okus dodatno su ocjenjeni i na bombonima bez inkapsulata. Posluženi su i uzorci bombonskog plašta za svaku recepturu kako bi se dobio dojam o okusu i konzistenciji samog plašta s obzirom na korištenje različitih škrobova. Izabrana senzorska svojstva ocijenjena su pomoću hedonističke skale intenziteta prema kojoj 9 označava izrazito izražen intenzitet, a 1 označava najmanje izražen intenzitet. Opća prihvatljivost ocijenjena je također prema 9-bodovnoj skali pri čemu se ocjena 9 povezuje s izuzetno prihvatljivim bombonskim proizvodom, a 1 najmanje prihvatljivim bombonskim proizvodom. Za neutralizaciju nepca prilikom senzorske analize posluženi su voda (sobne temperature) i kruh.

3.2.8.8. *In vitro digestija najbolje ocijenjenog bombonskog proizvoda u simuliranim uvjetima probavnog sustava*

Za *in vitro* digestiju bombona SGF i SSF su pripremljeni na isti način kao i za analizu inkapsulata. Dodatno, prije želučane faze provedena je simulacija oralne faze s SSF puferom u kojem je prethodno otopljen i izvagan enzim humane salivarne α -amilaze. Uzorkovanje se provelo odmah nakon 2 minuta. Cjelokupan protokol simulirane *in vitro* digestije kao i provedene HC i TPC analize jednako su provedeni kao i kod *in vitro* digestije inkapsulata (potpoglavlje 3.2.7. *In vitro* gastrointestinalna digestija).

3.2.9. Obrada podataka

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost uz pripadajuće standardne devijacije te su obrađeni u Microsoft excel programu verzije 2019.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada je inkapsulacija ekstrakta trave ive sušenjem raspršivanjema uz različite udjele i kombinacije polimernih nosača (arapske gume, guar gume, karboksimetil celuloze, kolagena i karagenana) te primjena inkapsulata u formulaciji bombonskog proizvoda. Prvotno, uparenom ekstraktu trave ive određen je bioaktivni sastav prikazan u tablici 6. Za određivanje uspješnosti primjene sušenja raspršivanjem, kao relativno jednostavne i ekonomične tehnike inkapsulacije, određen je prinos dobivenih inkapsulata (slika 6). Uzorcima inkapsulata analizirani su fizikalno-kemijski parametri (nasipna gustoća, Carr indeks, Hausnerov omjer, udio suhe tvari, močivost) i dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7. Inkapsulacijska učinkovitost (slike 7-10) i kapacitet punjenja (slike 11-14), kao dodatna dva mjerna parametra pomoću koji se procjenjuje uspješnost sušenja raspršivanjem, određeni su primjenom spektrofotometrijskih (TPC i HC) i HPLC-DAD metoda. Morfologija površina optimiziranih inkapsulata prikazana je na slici 15. S ciljem dodatne karakterizacije inkapsuliranih uzoraka provedena je i *in vitro* digestija u simuliranim uvjetima probavnog sustava određivanjem profila otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina (slike 16-21).

S obzirom na sve veću svijest potrošača te posljedično i potražnju za funkcionalnom hranom, u ovom radu je dobiveni polifenolni inkapsulat implementiran u bombonski proizvod s punjenjem pri čemu je razvijeno 5 različitih formulacija bombonskog plašta koristeći različite omjere kukuruznog i kuzu škroba (100 %, 50:50 i 75:25). Izgled bombonskih proizvoda prikazan je na slici 22. Obogaćenim gumenim bombonima određen je udio suhe tvari (tablica 8), bioaktivni sastav (slika 23) te teksturalna svojstva (tablica 9), a provedena je i senzorska analiza (slika 24) na temelju koje je odabran najprihvatljiviji proizvod. S odabranim bombonom provedena je *in vitro* digestija spektrofotometrijskim određivanjem profila otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (slika 25).

4.1. Rezultati bioaktivnog sastava ekstrakta trave ive

U karakterizaciji bioaktivnog sastava dobivenog uparenog ekstrakta, korištene su spektrofotometrijske metode za određivanja udjela ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina, dok je za identifikaciju i kvantifikaciju feniletanoidnih glikozida primijenjena HPLC-DAD analiza i dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Bioaktivna karakterizacija uparenog ekstrakta trave ive

TPC (g/100 mL)*	HC (g/100 mL)*	EHI (g/100 mL)	TEU (g/100 mL)*	STAH A (g/100 mL)*	POLI (g/100 mL)*	VERB (g/100 mL)
1,037 ± 0,03	0,816 ± 0,00	0,238 ± 0,00	0,069 ± 0,00	0,130 ± 0,00	0,092 ± 0,00	0,060 ± 0,00

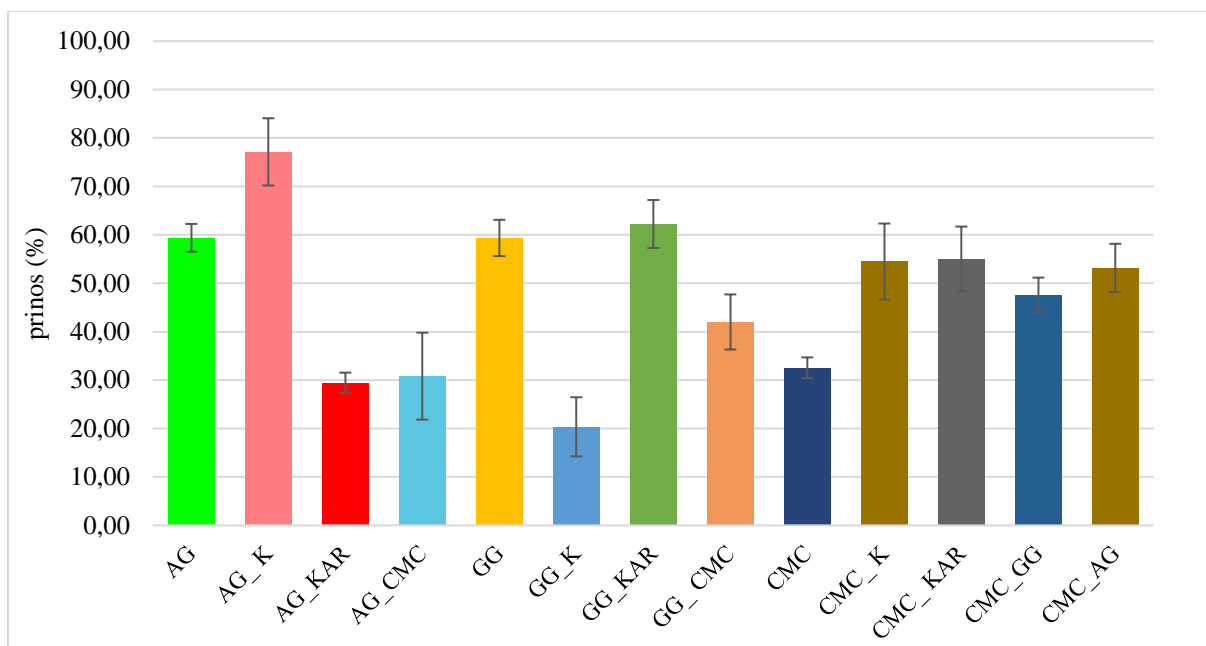
g/100 mL-izraženo kao g ehinakozida ili verbaskozida/100 mL

*g/100 mL-izraženo kao g ekvivalenta ehinakozida/ 100 mL ekstrakta
TPC-udio ukupnih polifenola; HC-hidrokscimetne kiseline; EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid

Istraživanja bioaktivnog sastava vrsta *Teucrium* navode tri skupine fenolnih spojeva: derivati hidrokscimetne kiseline, feniletanoidni glikozidi i flavonoidni glikozidi kao najzastupljenije fenolne spojeve u tim vrstama (Mihailović i sur., 2020). Istraživanja Tumbas i sur. (2004) te Nasić i sur. (2018) jasno potvrđuju kako se ovisno o ekstrakcijskom sredstvu razlikuju dobiveni rezultati za ukupni udio polifenola. Mitreski i sur. (2014) u svom istraživanju navode kako se većinski udio ukupnih polifenola odnosi na PhG i HC te se time potvrđuju dobiveni rezultati (tablica 6). Oko 80 % udjela TPC čine hidrokscimetne kiseline, a najzastupljeniji PhG je ehinakozid.

4.2. Prinos procesa sušenja raspršivanjem

Važan parametar ekonomičnosti i učinkovitosti procesa određuje se izračunom prinosa proizvoda koji je uglavnom veći od 50 %, što je prema Bhandari i sur. (1997) dokaz o uspješnosti sušenja raspršivanjem.



AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

Slika 6. Prinos inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem

Prema dobivenim rezultatima (slika 6) vrsta polimernog nosača kao i njihova međusobna kombinacija imala je značajan utjecaj na prinos proizvoda. Najznačajniji prinos je postignut kombinacijom AG_K ($77,3 \pm 6,94$ %), za razliku od GG_K koji ima značajno nizak prinos ($20,35 \pm 6,11$ %). Inkapsulati s CMC, kao glavnim nosačem imaju prinos u rangu od 32,55-55,00 %, s naglaskom da se dodatkom drugih polimera povećava prinos. Također je uočeno kako dodatak CMC od 25 % na ukupni udio polimera smanjuje prinos proizvoda. Correia-Filho i sur. (2019) inkapsulirali su β -karoten koristeći arapsku gumu u različitim udjelima (5-35 %) i pri različitim temperaturama (110-200 °C), pri čemu je prinos bio najveći korištenjem srednjih razina temperature i udjela gume. Kao razlog niskog prinosa navode zadržavanje praha u stijenci komore za sušenje, ciklona koji nije učinkovit u prikupljanju finih čestica te visoku viskoznost početne otopine. Koristeći 12 različitih biopolimera za inkapsulaciju ekstrakta zelenog čaja sušenjem raspršivanjem, Belščak-Cvitanović i sur. (2015) dobili su vrlo nizak prinos proizvoda s guar gumom. Tontul i Topuz (2017) u svom radu navode kako prinos proizvoda raste povećanjem udjela nosača jer se time povećava temperatura staklastog prijelaza. Razlika između temperature čestica pri sušenju raspršivanjem i temperature staklastog prijelaza ne smije biti velika jer pritom dolazi do lijepljenja praha u komori za sušenja jer isti nije dovoljno suh što rezultira nižim prinosom proizvoda. Također navode

kako dodatak škroba, maltodekstrina ili arapske gume kao nosača, povećava temperaturu staklastog prijelaza.

4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem

Uzorcima dobivenima sušenjem raspršivanjem analizirani su fizikalno-kemijski parametri i rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Fizikalno-kemijski parametri uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem

Uzorci	Nasipna gustoća (g/cm ³)	Carr indeks	Hausnerov omjer	% suhe tvari	Kontaktни kut (°)
AG	0,30 ± 0,02	3,66 ± 1,53	1,034 ± 0,02	95,91 ± 0,29	63 ± 0,50
AG_K	0,22 ± 0,01	19,60 ± 2,76	1,25 ± 0,04	92,95 ± 0,88	83 ± 2,05
AG_KAR	0,19 ± 0,01	22,08 ± 4,79	1,29 ± 0,08	95,74 ± 0,28	69 ± 0,50
AG_CMC	0,09 ± 0,00	23,04 ± 2,72	1,30 ± 0,05	98,35 ± 0,76	90 ± 3,40
GG	0,23 ± 0,02	15,28 ± 6,37	1,19 ± 0,09	92,19 ± 0,19	66 ± 1,00
GG_K	0,22 ± 0,00	5,01 ± 0,00	1,05 ± 0,00	88,16 ± 0,39	103 ± 2,50
GG_KAR	0,22 ± 0,00	13,63 ± 1,12	1,24 ± 0,11	87,49 ± 0,19	84 ± 3,50
GG_CMC	0,09 ± 0,00	18,03 ± 5,03	1,22 ± 0,07	89,92 ± 0,70	91 ± 7,50
CMC	0,08 ± 0,00	25,15 ± 1,39	1,34 ± 0,02	94,48 ± 0,92	144 ± 1,00
CMC_K	0,10 ± 0,00	22,01 ± 4,42	1,29 ± 0,07	97,20 ± 0,11	109 ± 5,73
CMC_KAR	0,12 ± 0,00	19,28 ± 2,60	1,24 ± 0,04	96,92 ± 0,34	107 ± 1,50
CMC_GG	0,11 ± 0,00	21,24 ± 5,39	1,28 ± 0,08	96,27 ± 0,05	143 ± 4,32
CMC_AG	0,10 ± 0,00	21,75 ± 3,89	1,28 ± 0,06	95,94 ± 0,21	136 ± 2,87

AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

4.3.1. Udio suhe tvari inkapsulata

Udio suhe tvari (tablica 7) tj. udio vode jedan je od glavnih karakteristika prahova. Cilj je proizvesti inkapsulat sa što manjim udjelom vode osiguravajući pritom mikrobiološku stabilnost, kao i manje zgrudnjavanje praha, a posljedično dugo i sigurno skladištenje. Prema Belščak-Cvitanović i sur. (2015) za dobru i dugoročnu stabilnost, učinkovito pakiranje i skladištenje, poželjan udio vode u prahovima je manji od 5 %. Suha tvar u inkapsulatima s arapskom gumom kao i CMC, kreće se u rasponu od 92,19-98,35 %, dok su inkapsulati s guar gumom zadržavali nešto veći udio vode što upućuje na bolju prikladnost arapske gume i CMC, kao glavnog nosača, u odnosu na guar gumu. Čujjić-Nikolić i sur. (2018) sušenjem raspršivanjem inkapsulirali su polifenole aronije koristeći arapsku gumu kao polimer te zaključuju kako dodatak arapske gume smanjuje udio vode u inkapsuliranim česticama. Kamthai i Magaraphan (2017) također potvrđuju kako hidroksilne skupina CMC-a ulaze u interakcije s molekulama vode te na taj način kontroliraju isparavanje vodene pare kroz matricu CMC filma osušenu raspršivanjem.

4.3.2. Nasipna gustoća, Carr indeks i Hausnerov omjer

Inkapsulatima je određena nasipna gustoća preko koje su izračunati Carr indeks (svojstvo tečenja) i Hausnerov omjer (svojstvo kohezivnosti) (tablica 7).

Nasipna gustoća važan je parametar praha hrane za skladištenje, obradu, pakiranje i distribuciju koji ovisi o veličini praha, obliku, svojstvima površine i veličini čestica (Goula i Adamopoloulos, 2004). Visoka nasipna gustoća poželjna je za smanjenje troškova otpreme i pakiranja. S druge strane, niska nasipna gustoća, kao što se vidi u aglomeriranim proizvodima, utječe na druga svojstva praha kao što su protočnost i trenutna svojstva. Na nasipnu gustoću mogu utjecati mnogi različiti čimbenici, koji uključuju gustoću čvrstih tvari, količinu zraka zarobljenu u česticama (okludirani zrak) ili gustoću čestica i količinu intersticijalnog zraka (zrak između čestica) (Kalyankar i sur., 2016). S obzirom na vrstu nosača uočeno je da uzorak s 0,8 % CMC ima najmanju ($0,083 \pm 0,00 \text{ g/cm}^3$), a inkapsulat s 4 % AG ima najveću vrijednost ($0,301 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$) nasipne gustoće. U sustavima inkapsulata s arapskom gumom tj. guar gumom u kombinaciji s drugim polimerima određene su niže vrijednosti nasipne gustoće, ali značajno niži rezultati su u kombinaciji s CMC polimerom. Lukasiewicz (1989) u svom istraživanju navodi kako je smanjena vrijednost nasipne gustoće rezultat zarobljenog zraka u atomiziranim kapljicama koji se zadržava u

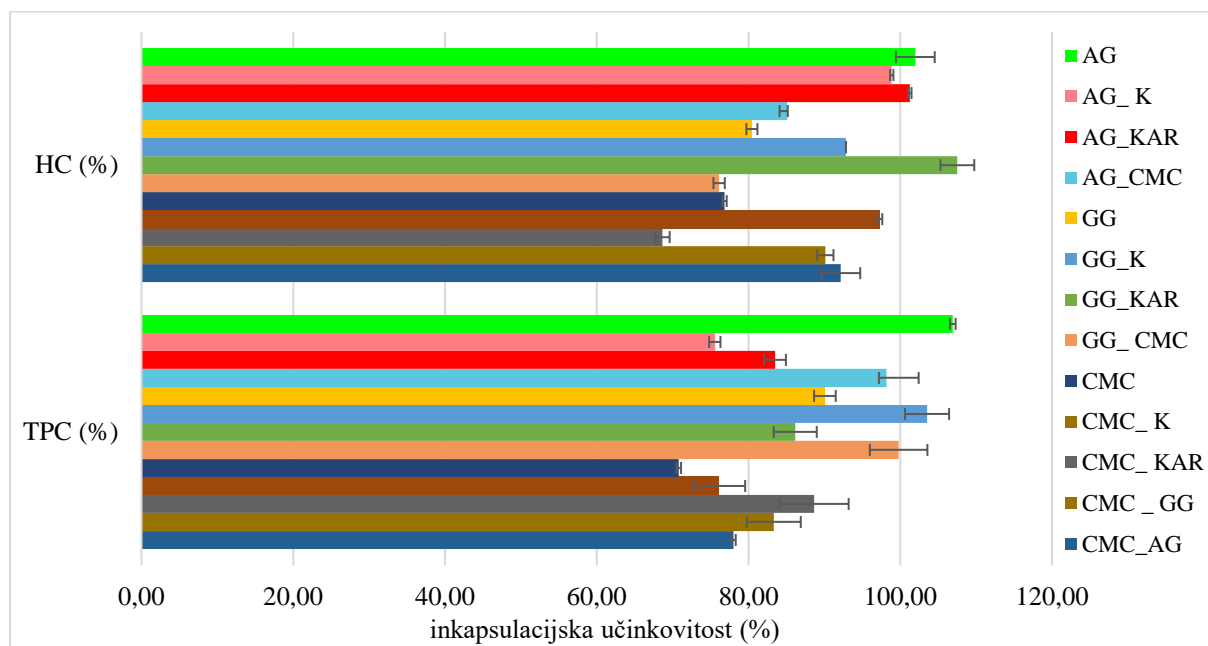
suhim granulama. Prema izračunatom Carr indeksu, uzorci spadaju u skupinu prahova s dobrom ili dovoljnom sposobnosti tečenja. Iznimka su sustavi s čistom AG te GG_K koji pokazuju vrlo dobru tecivost, ali i nisku kohezivnost prema Hausnerovom omjeru. Što se tiče vrijednosti kohezivnosti, gotovo svi uzorci pripadaju kategoriji srednje kohezivnosti, dok najveću ima inkapsulat s 0,8 % CMC-a ($1,336 \pm 0,02$).

4.3.3. Močivost

Procjena močivosti praha obično se temelji na određivanju kontaktnog kuta kruto-tekuće što je pokazatelj njihove hidrofobnosti (Lazghab i sur., 2005). Da bi došlo do vlaženja krutine (praha) kapljica vode mora se odvojiti od svojih okolnih molekula vode i „odgurnuti“ molekulu plina ili pare, koja se nalazi na površini krutine, stvarajući s molekulama krutine veze. Spontano vlaženje se događa ukoliko su adhezijske sile kruto-tekuće jače od kohezijskih sila tekućine i adhezijskih sila kruto/plin. Ukoliko je kontaktni kut manji od 90° močivost je veća, odnosno govorimo o hidrofilnim sustavima, a hidrofobne sustave s manjom močivosti karakterizira kontaktni kut veći od 90° . Iz dobivenih rezultata (tablica 7) vidljivo je kako su uzorci s čistom arapskom ili guar gumom, kao glavnim nosačem, hidrofilni, ali uz njihovu kombinaciju s drugim nosačima hidrofilnost se smanjuje odnosno kontaktni kut se povećava čime se smanjuje močivost. Krajnji cilj je dobiti inkapsulat sa smanjenom močivosti kako bi se povećala stabilnost inkapsulata u drugim sustavima, odnosno kako ne bi došlo do njihove rekonstrukcije u vodenoj otopini. Prema tome, najpogodniji su uzorci koji sadrže CMC s rasponom kontaktnog kuta od $90 - 144^\circ$.

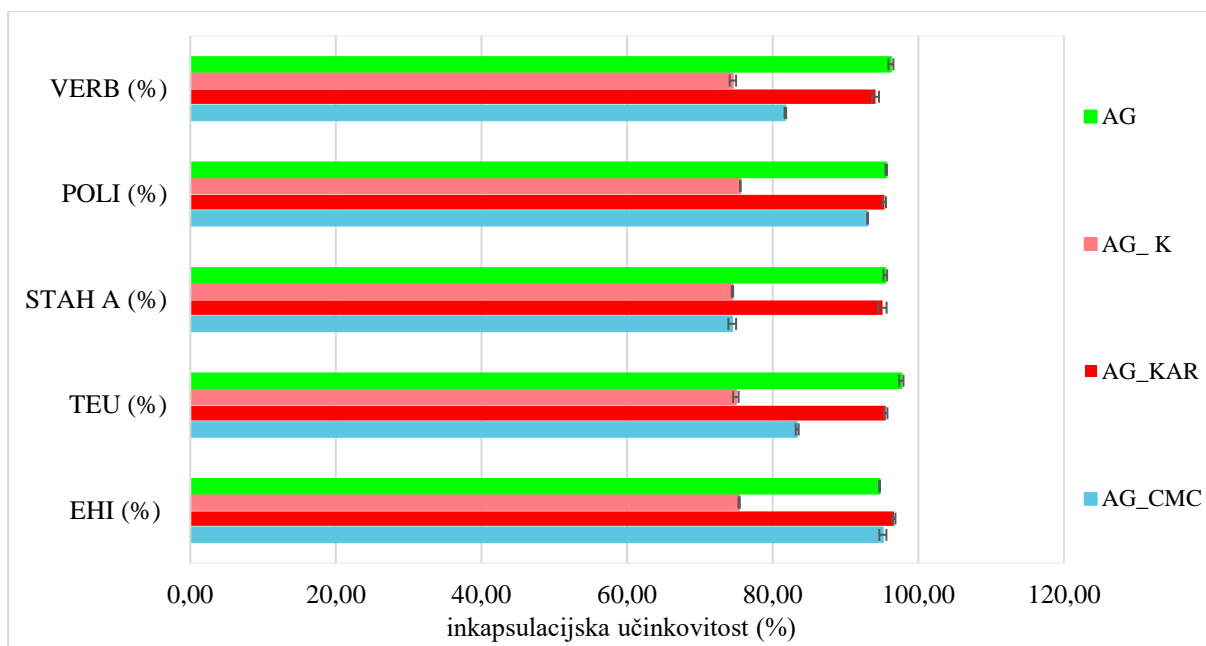
4.4. Bioaktivna karakterizacija inkapsulata

4.4.1. Inkapsulacijska učinkovitost



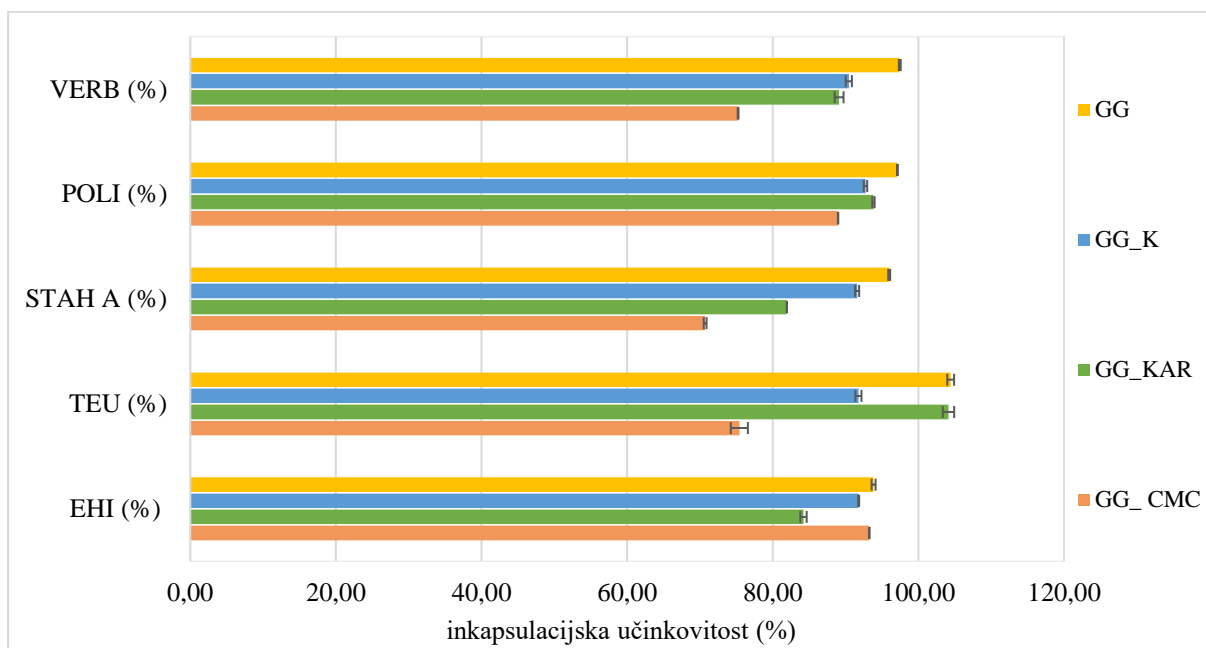
TPC-udio ukupnih polifenola; HC-hidroksicimetne kiseline; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

Slika 7. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (TPC) i hidroksicimetnih kiselina (HC) svih inkapsulata



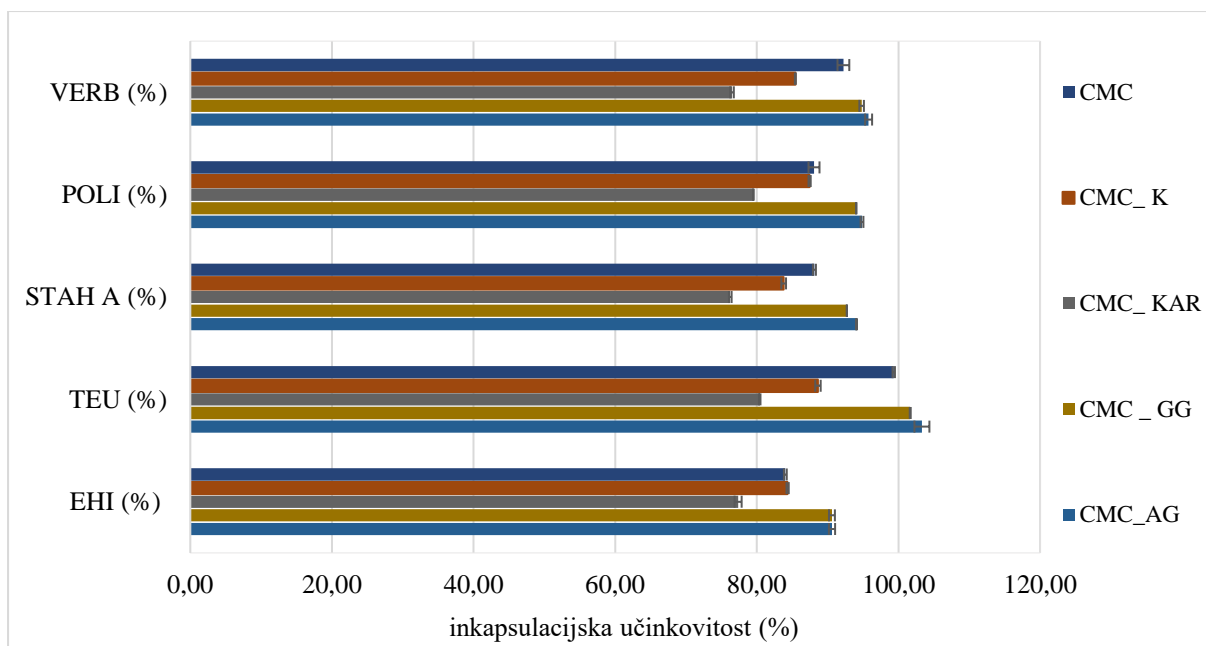
EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza

Slika 8. Inkapsulacijska učinkovitosti feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s arapskom gumom



EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza

Slika 9. Inkapsulacijska učinkovitosti feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s guar gumom



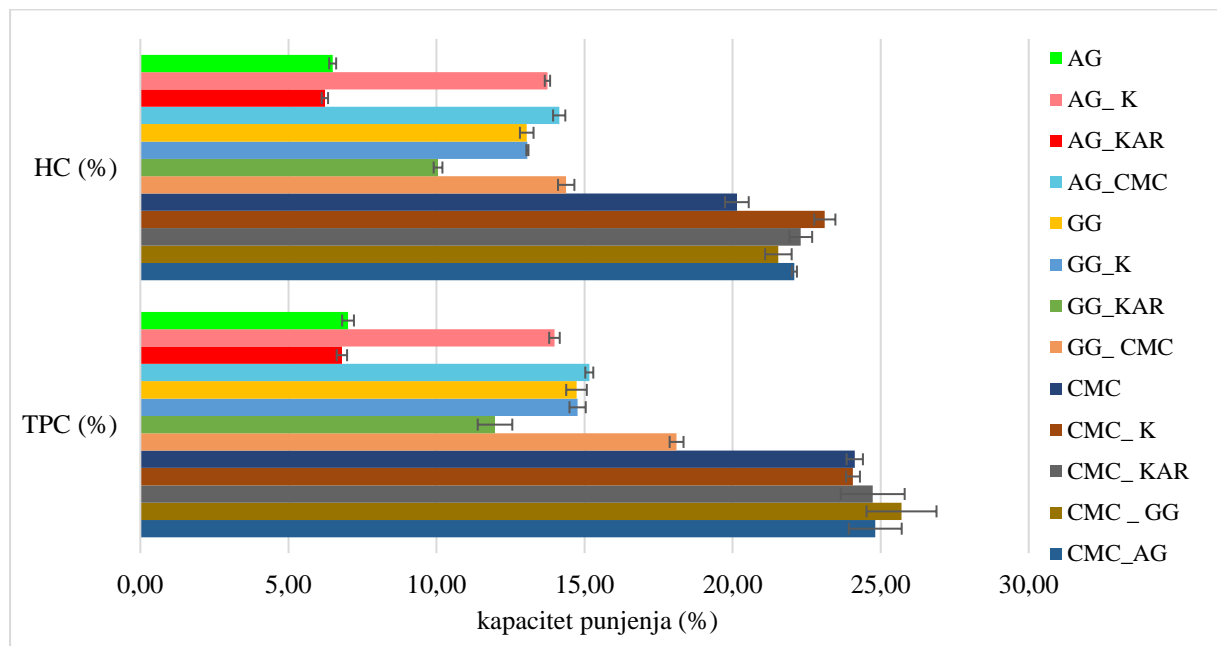
EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

Slika 10. Inkapsulacijska učinkovitosti feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s CMC-om

Inkapsulacijska učinkovitost (IU, %) određena je koristeći spektrofotometrijske (HC i TPC) metode i HPLC-DAD analizu pojedinačnih feniletanoidnih spojeva (ehinakozida, teupoliozida, stahizozida A, poliumozida i verbaskozida) u inkapsulatima, u odnosu na njihov udio u početnim otopinama, uzimajući u obzir udio suhe tvari u početnoj otopini i u dobivenim inkapsulatima. Prema rezultatima TPC-a i HC-a (slika 7), dobivene su visoke vrijednosti inkapsulacijske učinkovitosti. Za TPC, IU je u rasponu od 70,82-98,18 %, a za HC 68,87-98,88 %. Svi feniletanoidni glikozidi inkapsulirani su s visokom IU (>74 %), pri čemu se uglavnom vrijednosti kreću oko 90,00-95,00 % (slika 8-10). Također je uočeno da se povećanjem udjela polimernog nosača povećava IU jer nosači arapska guma i guar guma te njihove kombinacije u ukupnom udjelu od 4 % imaju nešto veću IU u odnosu na CMC i njegove kombinacije s ukupnim udjelom od 0,8 %. Corrêa-Filho i sur. (2019) zaključuju kako je koncentracija polimernog nosača jedan od čimbenika koji utječe na zadržavanje bioaktivnih spojeva zbog njihovog svojstva viskoznosti u početnoj otopini. Navode kako povećanje udjela krute tvari u početnoj otopini povećava zadržavanje bioaktivnih komponenti jer se smanjuje vrijeme za stvaranje „površinske kore“ u atomiziranim kapljicama na početku sušenja čime se stvara nepropusna „kora“ za spojeve s oksidativnom zaštitom bioaktivnih komponenti. Prema svim rezultatima kao najpogodniji materijali s najvišom IU, s obzirom na TPC, HC i pojedinačne PhG, istaknula se arapska guma što potvrđuju i Kalušević i sur.

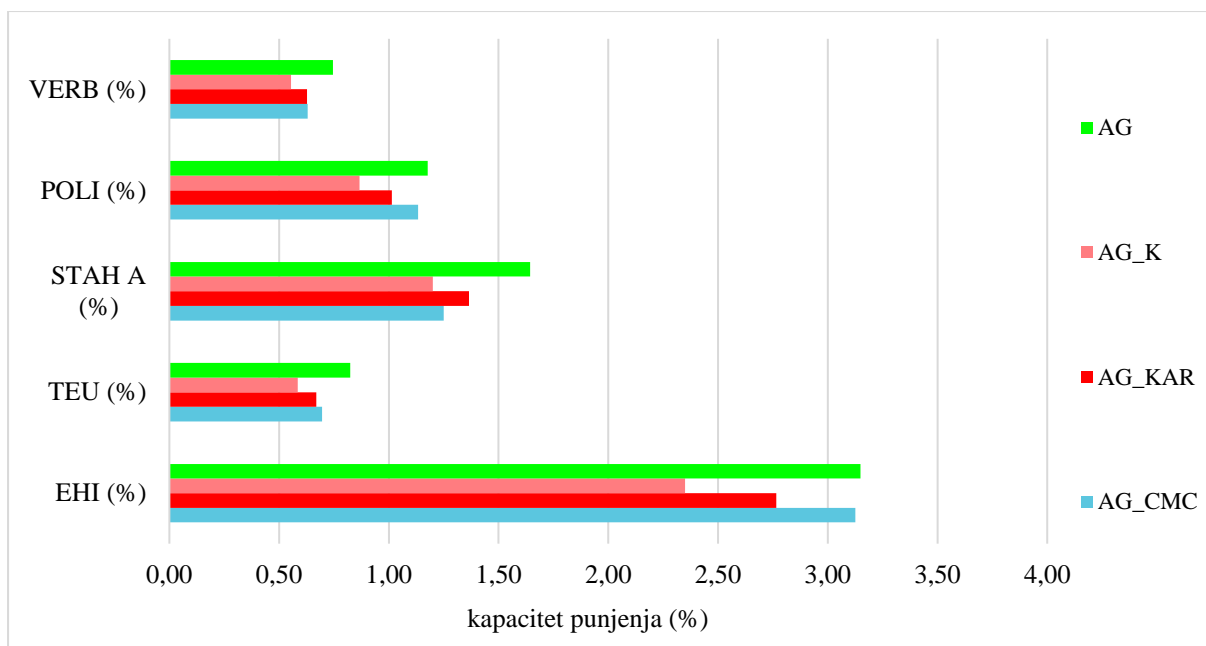
(2017) inkapsulirajući ekstrakt kože grožđa sušenjem raspršivanjem te koristeći različite nosače. Kao objašnjenje navode stvaranje vodikovih veza između fenolnih hidroksilnih skupina iz ekstrakta kože grožđa s neškrobnim polisaharidom poput arapske gume koja sadrži visok udio anionske frakcije zbog prisutnosti glukuronskog arabinogalaktana te na taj način arapska guma zadržava fenolni ekstrakt tijekom sušenja raspršivanjem.

4.4.2. Kapacitet punjenja



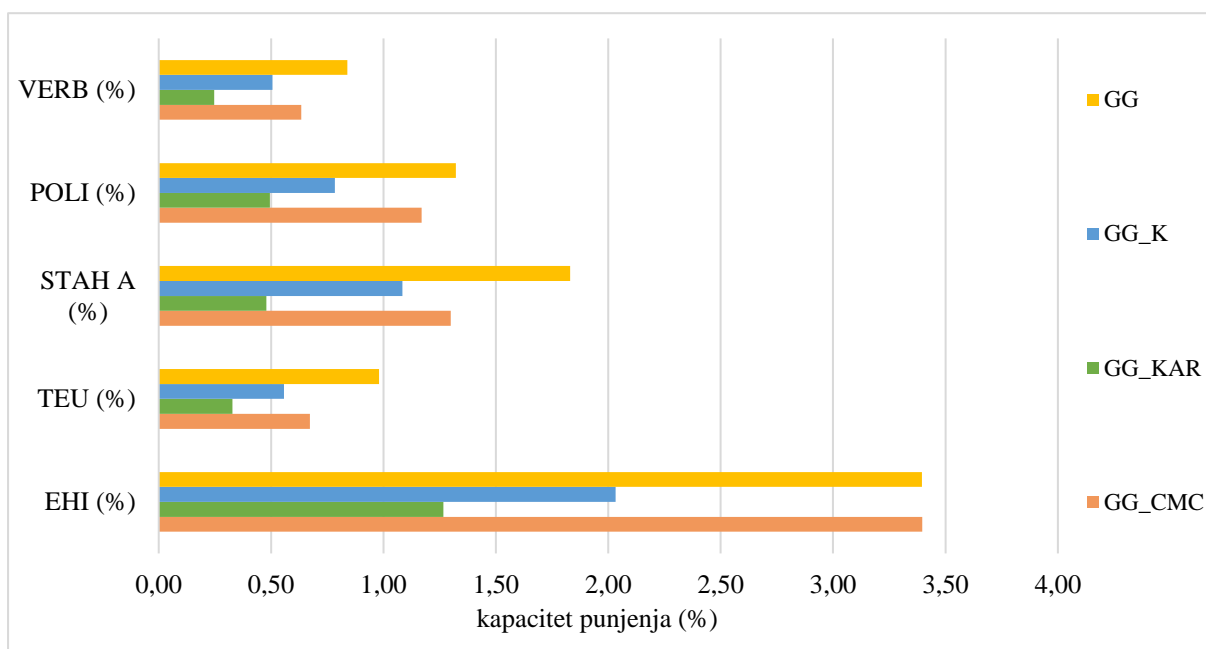
TPC-udio ukupnih polifenola; HC-hidroksicimetne kiseline; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

Slika 11. Kapacitet punjenja svih inkapsulata određen na temelju analize udjela ukupnih polifenola (TPC) i hidroksicimetnih kiselina (HC)



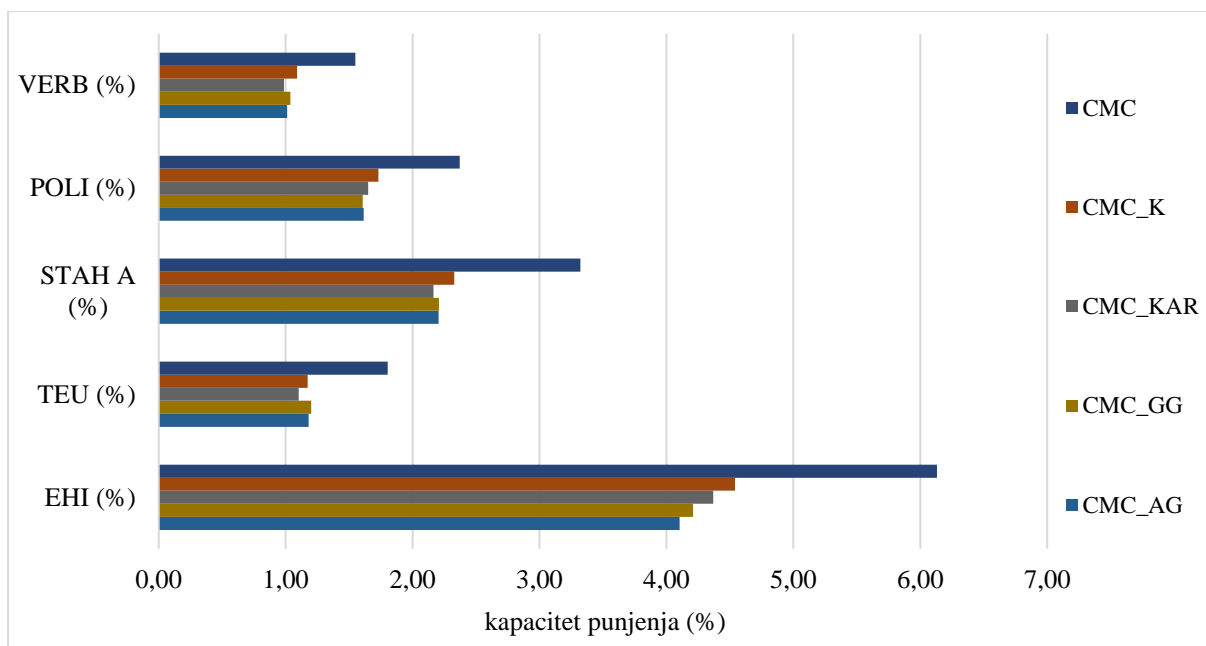
EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza

Slika 12. Kapacitet punjenja feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s arapskom gumom



EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza

Slika 13. Kapacitet punjenja feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s guar gumom



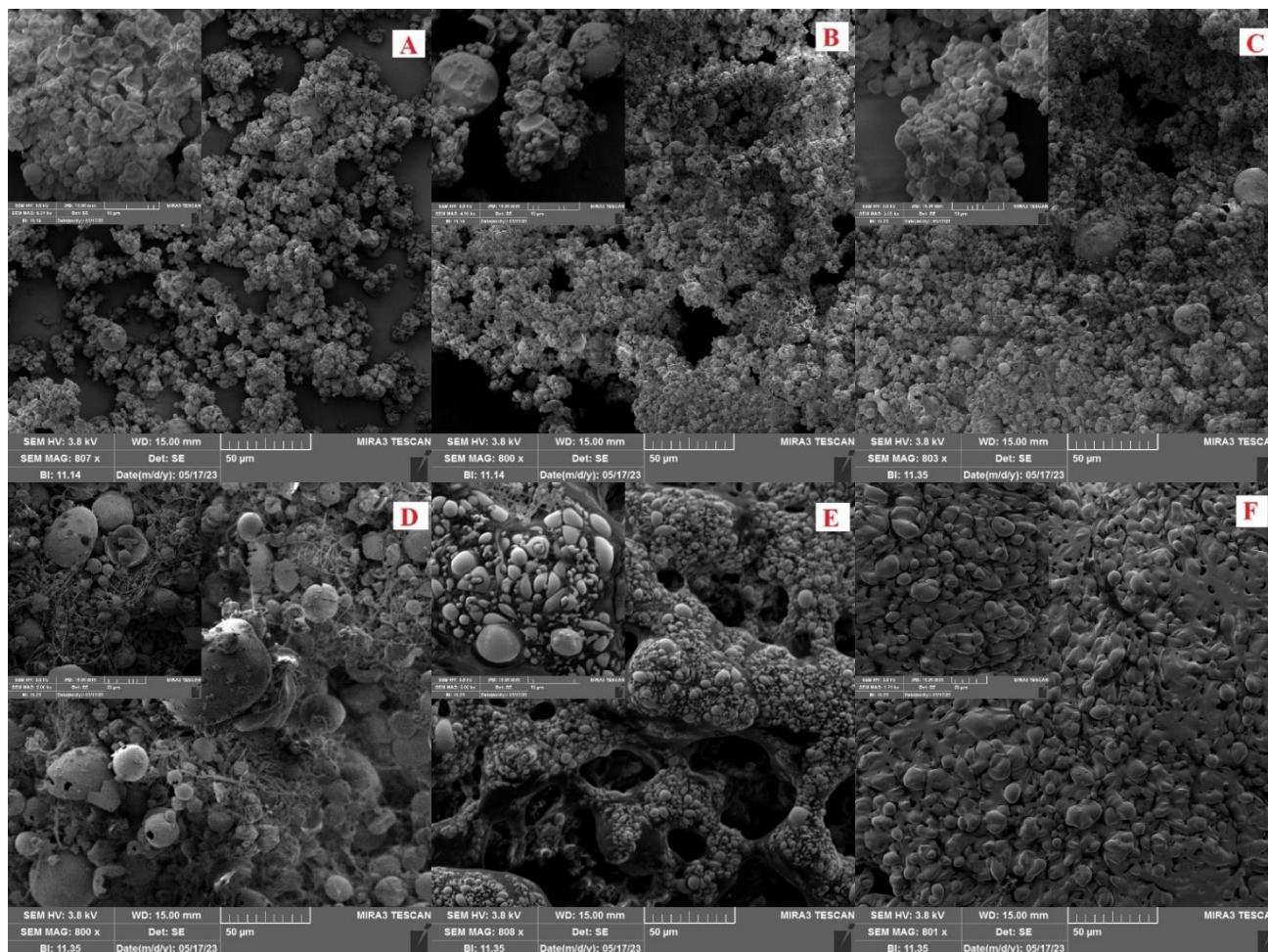
EHI-ehinakozid; TEU-teupoliozid; STAH A-stahizozid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma

Slika 14. Kapacitet punjenja feniletanoidnih spojeva kod inkapsulata s CMC-om

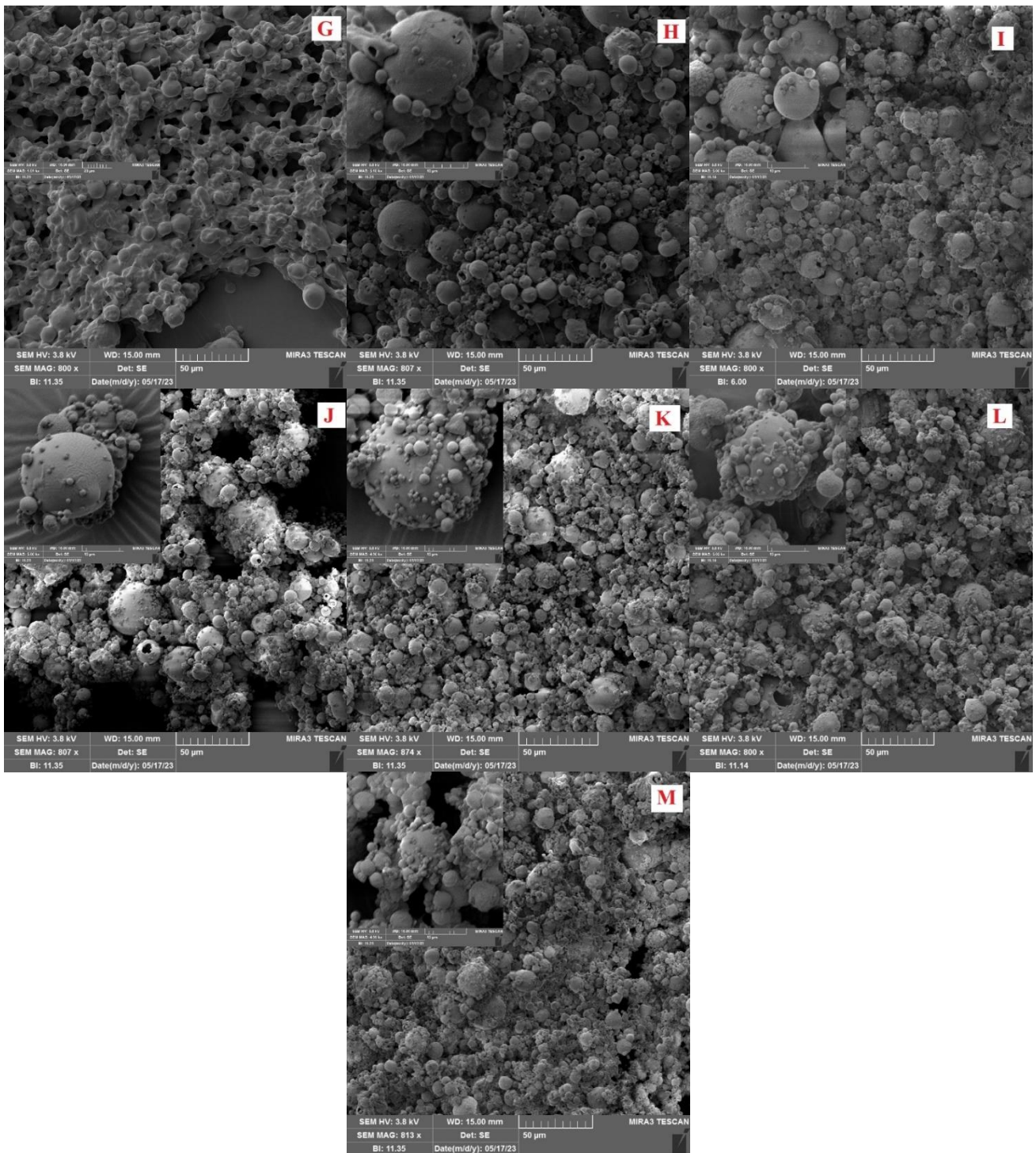
Provođenjem istih analiza kao za IU određen je i kapacitet punjenja (KP). Prema dobivenim rezultatima za TPC i HC (slika 11), KP je najveći za uzorke s CMC-om kao glavnim nosačem te su vrijednosti TPC-a u rasponu od 24,13-25,71 %, dok je za HC raspon 20,15-23,12 %. Pojedinačni spojevi određeni HPLC analizom (slika 12-14), s ehinakozidom koji dominira, također imaju najveći KP za uzorke s CMC-om. Zajedničko svim inkapsuliranim uzorcima su najveći KP za PhG ehinakozid, pri čemu se ističe rezultat za uzorak 0,8 % CMC koji iznosi 6,13 %. Određen je veći KP uzorcima s manje polimera, dok se povećanjem udjela polimera smanjuje KP što je suprotno dobivenim rezultatima za IU. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Şahin-Nadeem i sur. (2013) koji su utvrdili da je KP korištenjem maltodekstrina ili arapske gume za inkapsulaciju ekstrakta kadulje značajno smanjen povećanjem koncentracije nosača. Kao mogući drugi razlog koji doprinosi većem KP za CMC, kao glavnom nosaču, su stvaranje interakcija između PhG i CMC. Ključni čimbenik dobivanja učinkovitog sustava za isporuku su interakcije između fenola i polimera CMC koji stupa u selektivne interakcije s fenolima stvarajući kombinaciju vodikovih i hidrofobnih interakcija između celuloze i pojedinačnih polifenola te na taj način CMC ima sposobnost zadržavanja ovih bioaktivnih spojeva. Molekule veće molekulske mase imaju bolju sposobnost vezanja na celulozu. Vezanje polifenola ovisi o dostupnosti

celuloznih hidroksilnih skupina kao i o broju i konformacijskoj fleksibilnosti fenolnih prstenova u njihovoj strukturi (Corković i sur., 2021).

4.5. Morfološka karakterizacija inkapsulata skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)



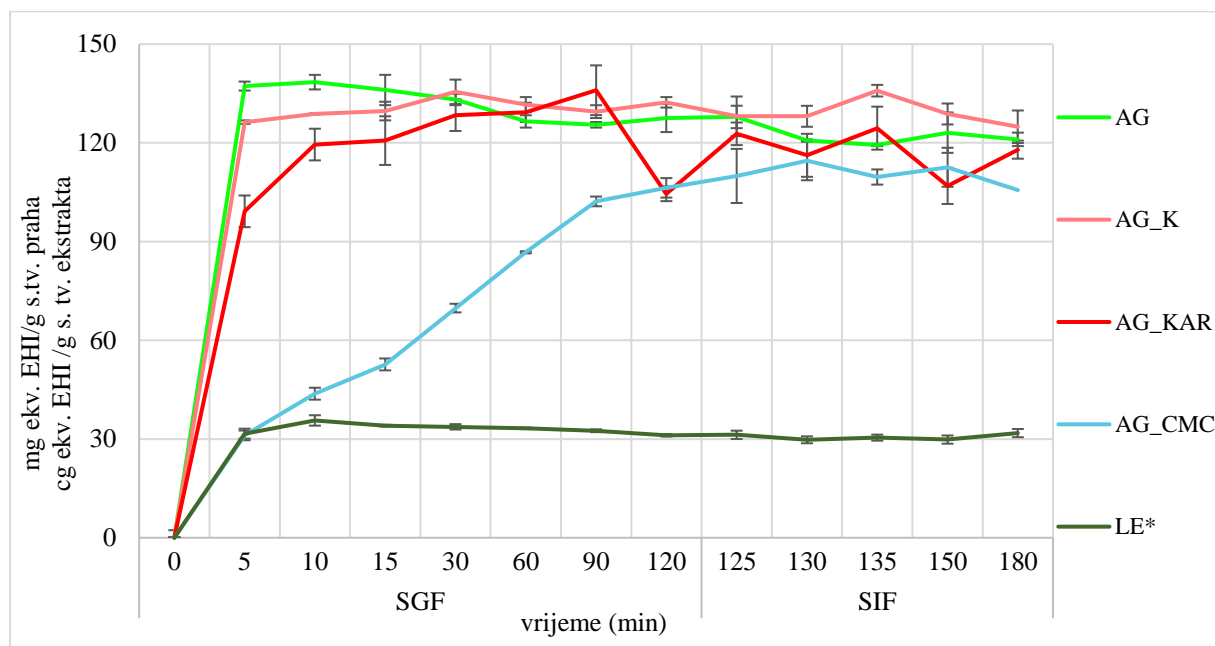
Slika 15. SEM prikaz (povećanje 800 x i slika gore lijevo 2 000/5 000 x) inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem vodenog ekstrakta *T. montanum* i različitih kombinacija materijala stijenke; **A.** 4 % arapska guma, **B.** 3 % arapska guma + 1 % kolagen, **C.** 3 % arapska guma + 1 % karagenan, **D.** 3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza, **E.** 4 % guar guma, **F.** 3 % guar guma + 1 % kolagen, **G.** 3 % guar guma + 1 % karagenan, **H.** 3 % guar guma + 1 % karboksimetil celuloza, **I.** 0,8 % karboksimetil celuloza, **J.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen, **K.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan, **L.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma, **M.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % arapska guma



Slika 15. SEM prikaz (povećanje 800 x i slika gore lijevo 2 000/5 000 x) inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem vodenog ekstrakta *T. montanum* i različitih kombinacija materijala stijenke; **A.** 4 % arapska guma, **B.** 3 % arapska guma + 1% kolagen, **C.** 3 % arapska guma + 1 % karagenan, **D.** 3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza, **E.** 4 % guar guma, **F.** 3 % guar guma + 1% kolagen, **G.** 3 % guar guma + 1 % karagenan, **H.** 3 % guar guma + 1 % karboksimetil celuloza, **I.** 0,8 % karboksimetil celuloza, **J.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen, **K.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan, **L.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma, **M.** 0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % arapska guma – *nastavak*

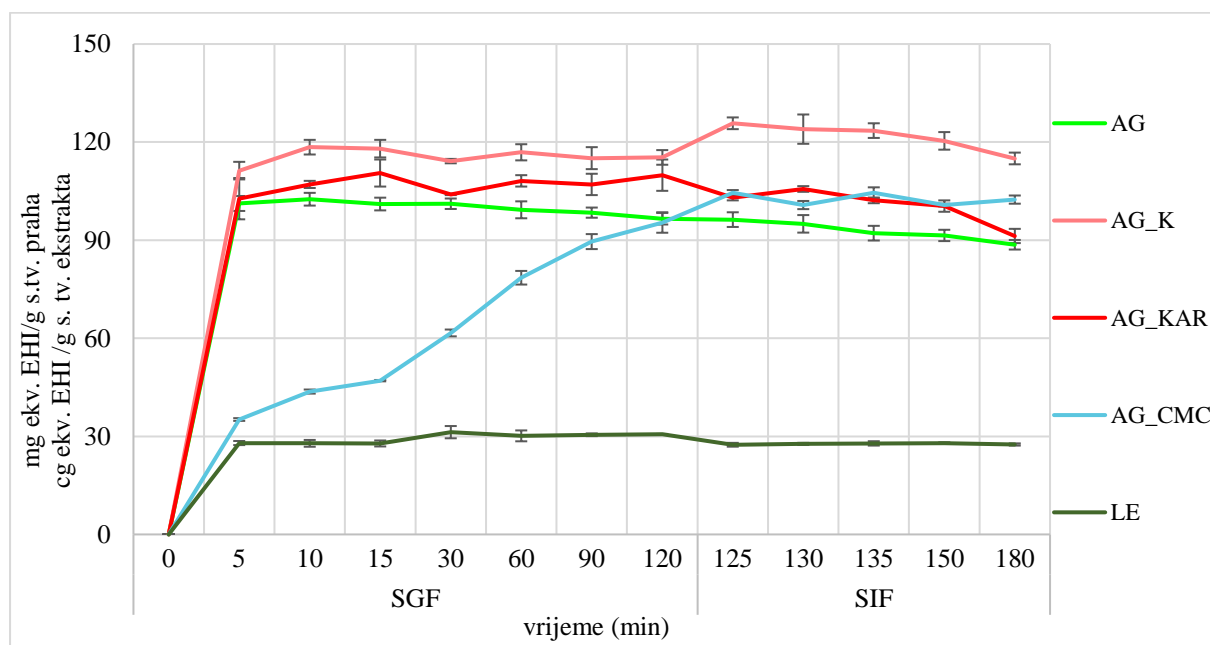
Morfologija inkapsuliranog praha *T. montanum* s različitim kombinacijama polimernih nosača prikazana je na slici 15. Vidljivo je da su mikrokapsule relativno sferičnog i nepravilnog oblika. Moguće je primijetiti kako korištenjem CMC kao glavnog nosača ili u kombinaciji s arapskom i guar gumom pridonosi stvaranju jednolikih sfernih čestica što potvrđuje i istraživanje Calegari i sur. (2022) koji ističu kako korištenje derivata celuloze rezultira stvaranje jednolikih čestica s homogenim površinama. Korištenjem CMC uočene su i pukotine na površini mikrokapsula što Kamthai i sur. (2017) objašnjavaju kao posljedica niske ulazne temperature, a visoke izlazne temperature. Molekula vode pokušava pobjeći ili eksplodirati od među i intramolekularnog povezivanja CMC kapljica te kao rezultat ostaju tragovi pukotina na površini. Prisutnost pukotina nije poželjno svojstvo jer se povećava izloženost površine i propusnost plinova što utječe na fizikalno-kemijsku i bioaktivnu stabilnost praha osušenog raspršivanjem. Uočeno je i grupiranje mikrokapsula uzrokujući aglomeraciju koja se istakla kod mikrokapsula s arapskom i guar gumom, kao glavnim nosačem, što je u skladu s Botrel i sur. (2014) koji potvrđuju stupanj aglomeracije korištenjem guma kao polimera. U slučaju korištenja guar gume posebno se može primijetiti naboranost čestica što su prethodno primijetili i Belščak-Cvitanović i sur. (2015), a pripisuju neravnomjernom sušenju i skupljanju. Skupljanje se javlja zbog spore difuzije inkapsuliranih bioaktivnih spojeva. Oni se skupljaju u blizini površine stvarajući sve deblju i deblju koru na površini čestice dok se ne formira šuplja čestica nakon čega dolazi do skupljanja kore u česticu konveksno-konkavnog oblika.

4.6. *In vitro* digestija inkapsulata u simuliranim uvjetima probavnog sustava



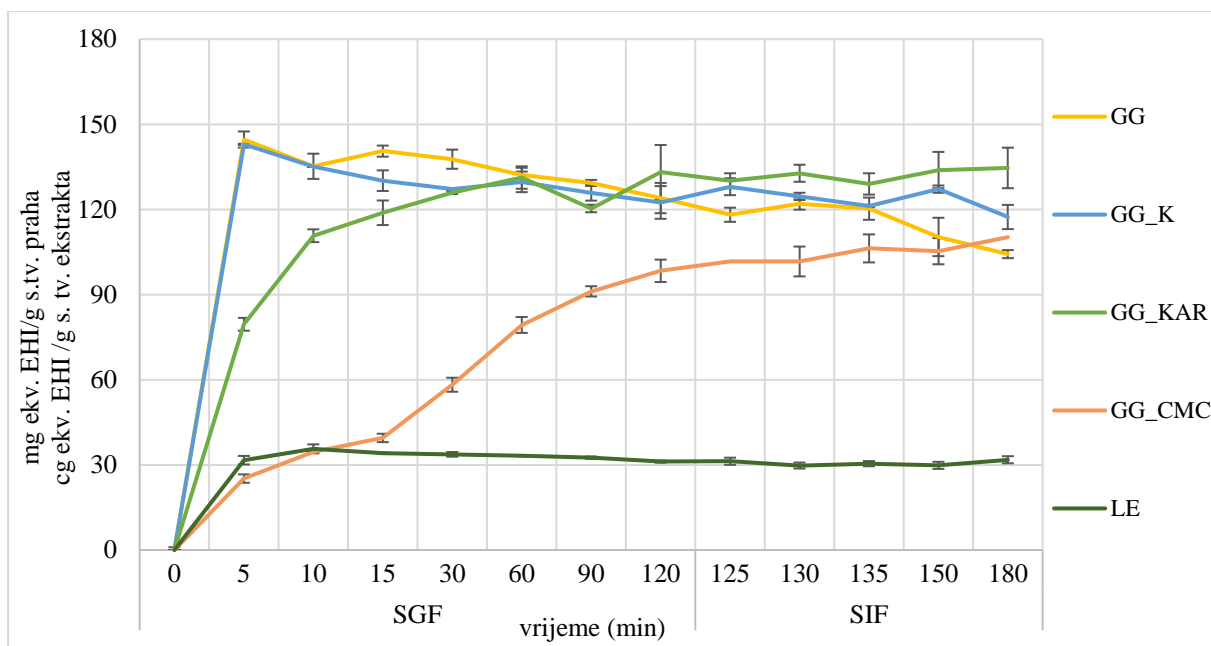
* LE-liofilizirani ekstrakt; SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma

Slika 16. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s arapskom gumom kao glavnim nosačem



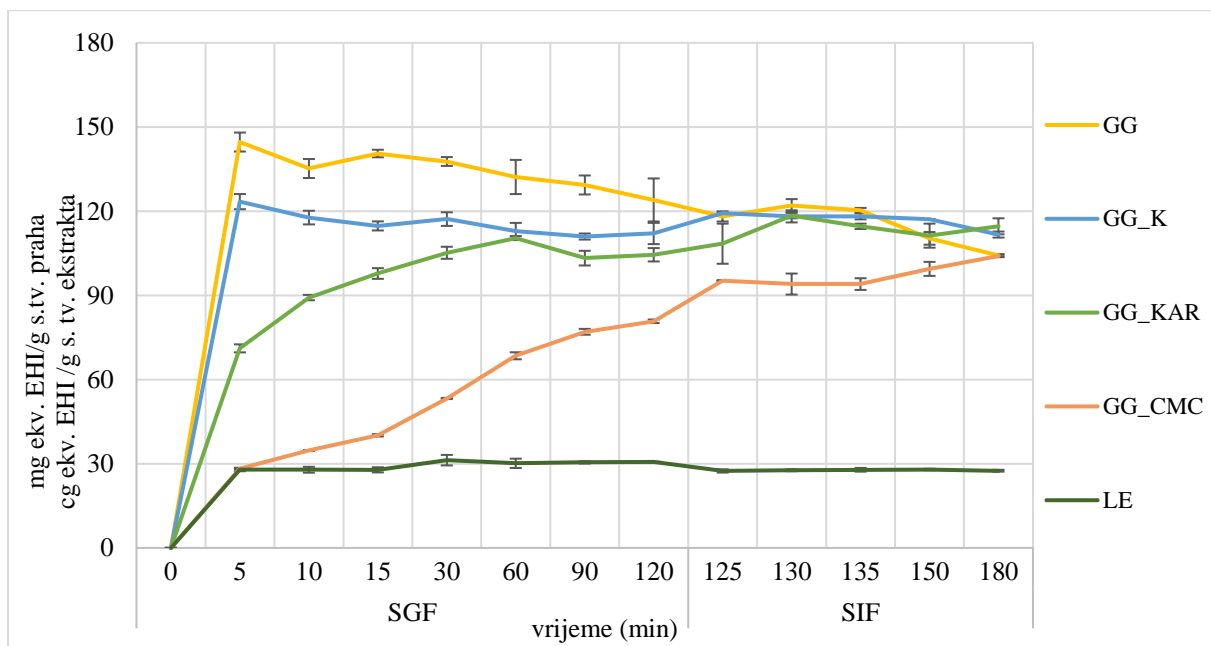
SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; AG-4 % arapska guma; AG_K-3 % arapska guma + 1 % kolagen; AG_KAR-3 % arapska guma + 1 % karagenan; AG_CMC-3 % arapska guma + 1 % karboksimetil celuloza; GG-4 % guar guma; LE- liofilizirani ekstrakt

Slika 17. Kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s arapskom gumom kao glavnim nosačem



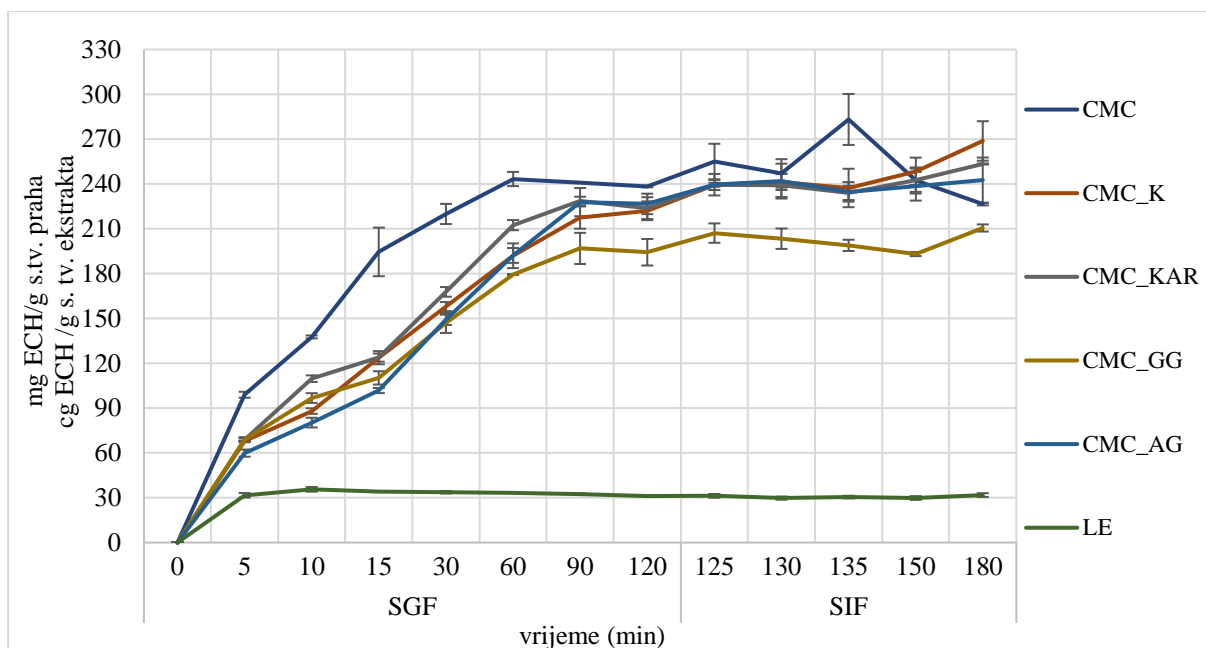
SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; LE- liofilizirani ekstrakt

Slika 18. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s guar gumom kao glavnim nosačem



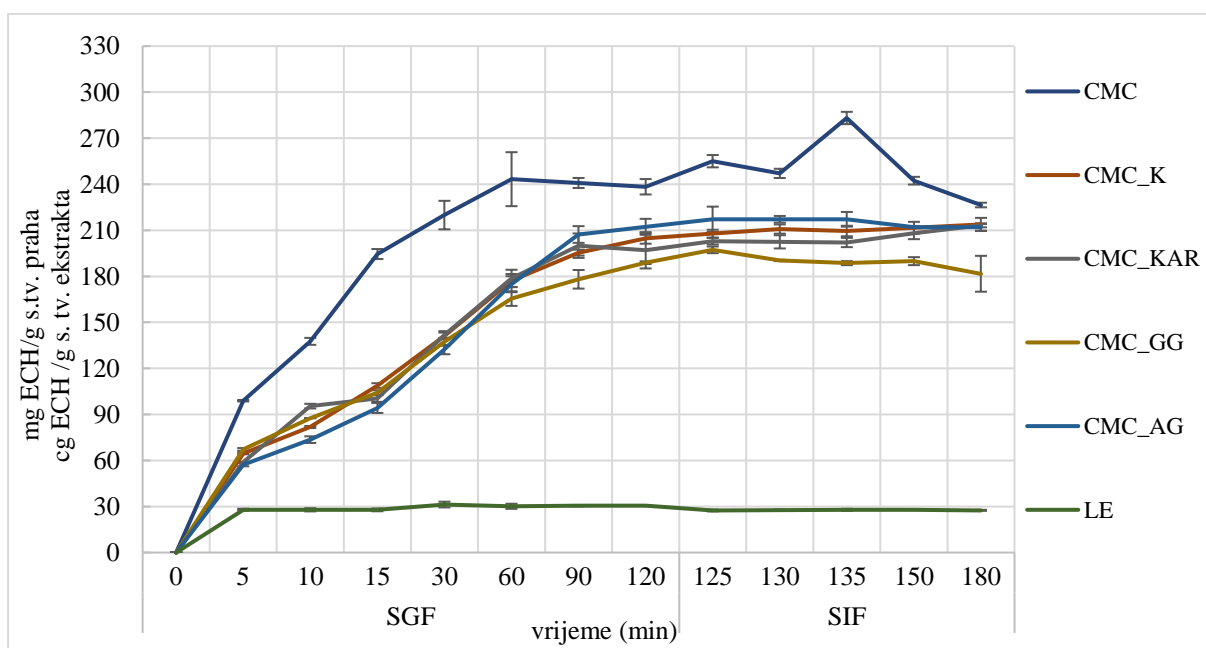
SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; GG-4 % guar guma; GG_K-3 % guar guma + 1 % kolagen; GG_KAR-3 % guar guma + 1 % karagenan; GG_CMC-3% guar guma + 1 % karboksimetil celuloza; LE- liofilizirani ekstrakt

Slika 19. Kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s guar gumom kao glavnim nosačem



SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma; LE- liofilizirani ekstrakt

Slika 20. Kinetyka otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s CMC-om kao glavnim nosačem



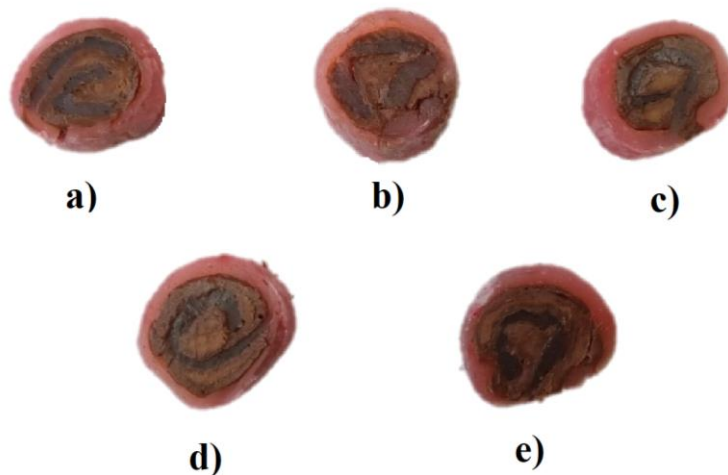
SGF-puferska otopina za simulaciju želučane faze; SIF-puferska otopina za simulaciju intestinalne faze; CMC-0,8 % karboksimetil celuloza; CMC_K-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % kolagen; CMC_KAR-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % karagenan; CMC_GG-0,6 % karboksimetil celuloza + 0,2 % guar guma; CMC_AG-0,6 % karboksimetil celuloza + arapska guma; LE- liofilizirani ekstrakt

Slika 21. Kinetyka otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava za inkapsulate s CMC-om kao glavnim nosačem

Jedan od glavnih ciljeva inkapsulacije bioaktivnih komponenata je osiguranje postepenog i kontroliranog otpuštanja aktivnih tvari tijekom vremena. U ovom radu, *in vitro* digestija formuliranih inkapsulata praćena je TPC i HC metodom kako bi se odredio udio ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina otpuštenih nakon definiranog vremenskog intervala. Želudac i tanko crijevo predstavljaju mjesta u našem organizmu gdje se polifenolni spojevi metaboliziraju i apsorbiraju. Pod postepenim otpuštanjem bioaktivnih spojeva podrazumijeva se postepeni rast krivulje tijekom cijele analize. Liao i sur. (2021) objašnjavaju kako na oslobodjenje materijala jezgre iz mikrokapsula ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su struktura mikročestica, topljivost praha, interakcije između materijala jezgre i nosača, kao i o otpornosti na enzime i pH. Prema dobivenim rezultatima, kod arapske gume (slika 16-17) i guar gume (slika 18-19) nije postignuta željena postepena kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina obzirom da su se ukupni polifenoli otpustili u prvih 5-10 minuta. Belščak-Cvitanović i sur. (2015) iznose suprotno dobivene rezultate prema kojima uporaba arapske gume i karagenana omogućuje produljeno otpuštanje ukupnih polifenola u SGF s nastavkom otapanja u SIF fazi. Suprotan rezultat postignut je korištenjem CMC-a, kao glavnog nosača, gdje je primijećeno postepeno otpuštanje ukupnih polifenola (slika 20) i hidroksicimetnih kiselina (slika 21) tijekom svih 180 minuta *in vitro* simulacije. Profil postepenog otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina može se povezati s rezultatima močivosti inkapsulata gdje se CMC pokazao kao najpogodniji nosač s najmanjom močivosti s obzirom na svoju hidrofobnost. S druge strane arapska guma i guar guma zbog svoje hidrofinitosti i niskog kontaktnog kuta tj. veće močivosti tijekom *in vitro* digestije se brže otope u puferskoj otopini i time dolazi do bržeg otpuštanja bioaktivnih spojeva.

4.7. Analiza formuliranih bombonskih proizvoda

4.7.1. Izgled bombonskih proizvoda



Slika 22. Izgled bombonskih proizvoda: a) 100 % gustin, b) 75 % gustin : 25 % kuzu, c) 50 % gustin : 50 % kuzu, d) 75 % kuzu : 25 % gustin, e) 100 % kuzu

Na slici 22 prikazan je izgled bombonskih proizvoda nakon proizvodnje. Gumeni bomboni s punjenjem formulirani su kao rolada gdje je bombonski plašt crvenkaste boje, a čokoladno punjenje smeđe boje. Prema vizualnoj kontroli svi su ujednačenog izgleda i ujednačene debljine plašta i punjenja.

4.7.2. Određivanje udjela suhe tvari

Udio suhe tvari, važan je parametar prehrambenih proizvoda pomoću kojeg se definira rok trajanja i kvaliteta s obzirom da taj udio utječe na fizikalno-kemijske, biokemijske i mikrobiološke procese kao i na izgled konačnog proizvoda.

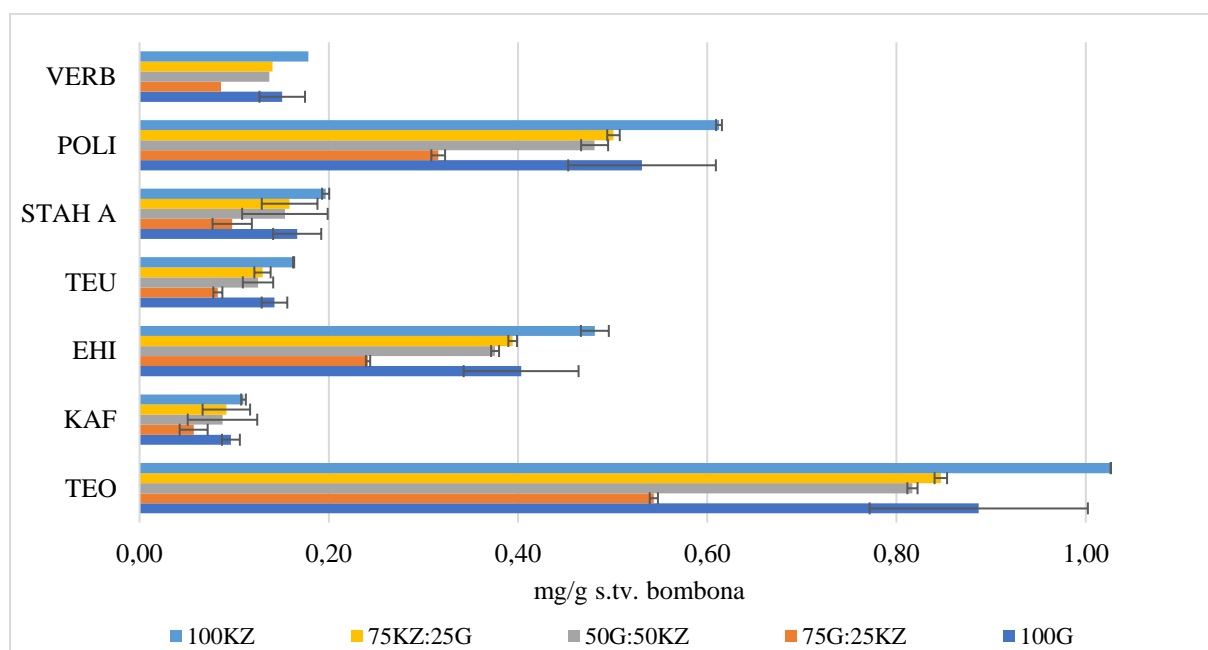
Tablica 8. Udio suhe tvari formuliranih bombonskih proizvoda

Bombonski uzorci	Udio suhe tvari (%)
100G	93,75 ± 0,94
75G:25KZ	95,48 ± 0,50
50G:50KZ	93,86 ± 2,07
75KZ:25G	96,86 ± 1,21
100KZ	94,66 ± 0,19

100G-100 % gustin; 75G:25KZ-75 % gustin + 25 % kuzu; 50G:50KZ-50 % gustin + 50 % kuzu; 75KZ:25G-75 % kuzu + 25 % gustin; 100KZ-100 % kuzu

U tablici 8 prikazani su rezultati udjela suhe tvari bombonskih proizvoda s rasponom vrijednosti od 93-97 %. Delgado i Bañón (2015) ističu kako bi gumeni bombon sa želatinom finalno trebali sadržavati najmanje 75 % suhe tvari. Analizom gumenih bombona s prahom Jaban lubenice, Tarahi i sur. (2023) odredili su smanjenje udjela vode s povećanjem udjela praha Jaban lubenice i limunske kiseline. O istom trendu smanjenja sadržaja vode koristeći prah kože grožđa u voćnim bombonima s pektinom zapazili su i Cappa i sur. (2015), kao i Ali i sur. (2021) dodatkom vlakana jagode i crvene cikle u žele bombonima.

4.7.3. Bioaktivna karakterizacija



TEO-teobromin; KAF-kafein; EHI-ehinakoizid; TEU-teupolioizid; STAH A-stahizoizid A; POLI-poliumozid; VERB-verbaskozid; 100G-100 % gustin; 75G:25KZ-75 % gustin + 25 % kuzu; 50G:50KZ-50 % gustin + 50 % kuzu; 75KZ:25G-75 % kuzu + 25 % gustin; 100KZ-100 % kuzu

Slika 23. Udio feniletanoidnih glikozida i metilksantina u bombonskim proizvodima

Udio pojedinačnih komponenata (teobromina (TEO), kafeina (KAF), ehinakoizida (EHI), teupolioizida (TEU), stahizoizida A (STAH A), poliumozida (POLI) i verbaskozida (VERB)) ispitivanih uzoraka bombona izražen je u mg/g bombona te su rezultati grafički prikazani na slici 23. Prema dobivenim podacima u jednoj porciji bombona (6 g) moguće je unijeti prosječno $7,74 \pm 1,58$ mg PhG prisutnih u inkapsulatu koji je inkorporiran u bombonsko punjenje. 67 % ukupnog udjela PhG odnosi se na sumu ehinakoizida i poliumozida koji su najzastupljeniji PhG u porciji bombona. Prisutnost čokolade u punjenju dodatno obogaćuje bombon metilksantinima, teobrominom i kafeinom, čiji je prosječni udio na jednu porciju bombona $5,49 \pm 1,05$ mg.

4.7.4. Teksturalna svojstva

Teksturalna svojstva jedan su od najvažnijih pokazatelja kvalitete konditorskih proizvoda s obzirom da utječu na stav i percepciju potrošača. Parametri teksture prehrambenih proizvoda razlikuju se na mikroskopskoj i makroskopskoj razini zbog različitih interakcija između strukturnih i ostalih elemenata proizvoda kao i korištenih procesa tijekom proizvodnje.

Tablica 9. Teksturalna svojstva uzoraka bombona s i bez punjenja

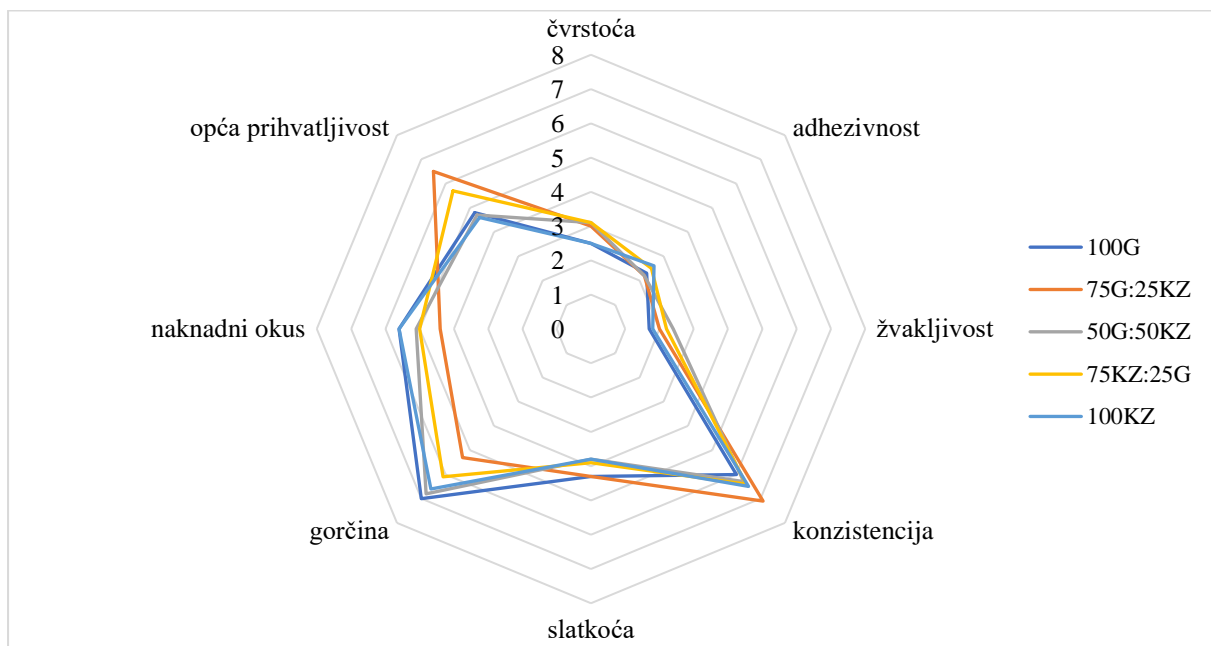
Bombonski uzorci	Sila probijanja površine (N) (TVRDOĆA)	Progib površine prije probijanja (mm) (ELASTIČNOST)	Rad probijanja površine (Nmm)
100G_bp	0,12 ± 0,02	2,02 ± 0,56	0,20 ± 0,08
100G_p	0,17 ± 0,01	2,04 ± 0,61	0,23 ± 0,06
75G:25KZ_bp	0,07 ± 0,01	0,95 ± 0,10	0,06 ± 0,01
75G:25KZ_p	0,10 ± 0,01	0,69 ± 0,15	0,06 ± 0,02
50G:50KZ_bp	0,09 ± 0,00	1,26 ± 0,21	0,09 ± 0,02
50G:50KZ_p	0,15 ± 0,01	0,98 ± 0,06	0,10 ± 0,01
75KZ:25G_bp	0,07 ± 0,01	1,11 ± 0,61	0,07 ± 0,05
75KZ:25G_p	0,10 ± 0,01	1,52 ± 0,30	0,13 ± 0,03
100KZ_bp	0,06 ± 0,01	2,51 ± 0,43	0,15 ± 0,03
100KZ_p	0,07 ± 0,01	0,69 ± 0,14	0,05 ± 0,01

bp-bombon bez punjenja, p-bombon s punjenjem; 100G-100 % gustin; 75G:25KZ-75 % gustin + 25 % kuzu; 50G:50KZ-50 % gustin + 50 % kuzu; 75KZ:25G-75 % kuzu + 25 % gustin; 100KZ-100 % kuzu

U ovom radu tvrdoća (0,06-0,17 N), elastičnost (0,69-2,51 mm) i rad probijanja površine uzorka (0,05-0,23 Nmm) parametri su na temelju kojih se procjenjuju teksturalna svojstva gumenih bombona (tablica 9). Tvrdoća kao teksturalni parametar definira se kao maksimalna sila primijenjena tijekom prve kompresije da deformira uzorak. Iz dobivenih rezultata uočeno je kako čokoladno punjenje pridonosi tvrdoći bombonskih uzoraka, tako je na bombonima s punjenjem zabilježena nešto veća tvrdoća u odnosu na one bez punjenja. Također, 100 % kukuruzni škrob (100G_p ; 0,17 ± 0,01 N) pokazuje veću tvrdoću u odnosu na 100 % kuzu škrob (100KZ_p ; 0,07 ± 0,01). Na temelju rezultata tvrdoće Tarahi i sur. (2023) zaključuju

kako smanjenjem udjela vode tvrdoća gumenih bombona se povećava čime potvrđuju tezu da je udio vode jedan od važnijih parametara koji utječu na teksturalna svojstva konditorskih proizvoda. Slijedeći važan parametar je elastičnost koja se povezuje s visinom koju hrana dobije tijekom vremena koje prođe između kraja prvog i početka drugog ugriza. Visoka elastičnost povezuje se s većom potrebnom energijom žvakanja u ustima. Rezultati pogiba površine prije probijanja pokazuju kako se povećanjem udjela kuzu škroba povećava elastičnost bombonskog proizvoda. Posljednji parametar je rad potreban za probijanje površine uzorka što Delgado i Bañón (2015) nazivaju žvakljivost (sposobnost žvakanja). Žvakljivost je umnožak tvrdoće, kohezivnosti i elastičnosti te zato pokazuje sličan trend kao vrijednosti dobivene za tvrdoću i elastičnost pri čemu se ističu uzorci 100G i 100KZ.

4.7.5. Senzorska svojstva



100G-100 % gustin; 75G:25KZ-75 % gustin + 25 % kuzu; 50G:50KZ-50 % gustin + 50 % kuzu; 75KZ:25G-75 % kuzu + 25 % gustin; 100KZ-100 % kuzu

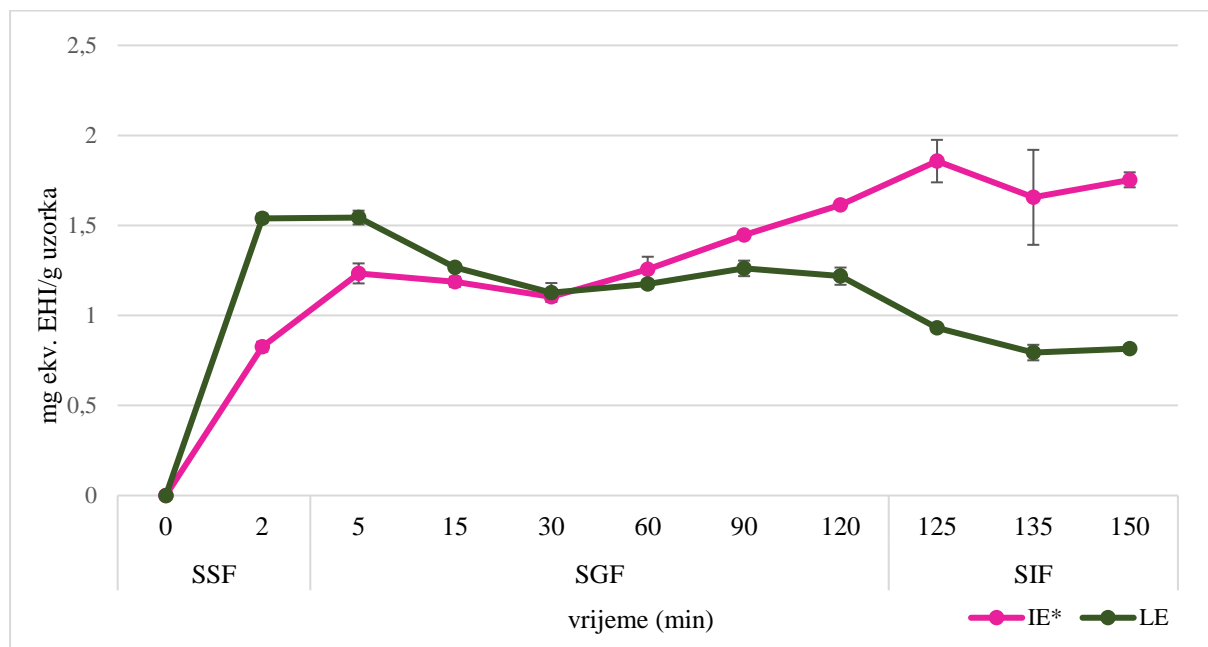
Slika 24. Senzorska svojstva formuliranih funkcionalnih bombona

U procjeni utjecaja korištenih škrobova (kukuruzni i kuzu) i inkorporacije inkapsulata CMC_KAR u formulaciji gumenih bombona potrebno je ispitati senzorsku prihvatljivost s obzirom da različite zamjene i dodatci, u odnosu na konvencionalno korištene sirovine, mogu negativno utjecati na prihvatljivost od strane potrošača. Obzirom na teksturalna svojstva, svih 5 bombonskih receptura relativno su podjednako ocijenjene od strane panelista te su rezultati prikazani na slici 24. Čvrstoća, adhezivnost i žvakljivost najmanje su izražena senzorska svojstva u odnosu na konzistenciju i gorčinu koji su najizraženiji. Altınok i sur. (2019)

žvakljivost definiraju kao energiju potrebnu za žvakanje čvrste hrane do stanja spremnog za gutanje, a adhezivnost kao rad uložen za prevladavanje privlačne sile između površine hrane i površine drugih materijala s kojima hrana dolazi u kontakt. Panelisti su postigli gotovo slične rezultate za parametre teksture kao i uz pomoć analizatora teksture gdje također čvrstoća (tvrdoća) i žvakljivost pokazuju niske vrijednosti. Slatkoća bombona prosječno je ocijenjena s $4,02 \pm 0,23$ za razliku od dominantne gorčine ocijenjene sa $6,36 \pm 0,61$, kojoj prema Le Bourvellec i Renard (2012) pridonosi visok udio polifenola u biljnim namirnicama. Više ocjene naknadnog okusa očekivane su kao posljedica jače izražene gorčine koja potječe od inkapsuliranog ekstrakta trave ive. Na temelju opće prihvatljivosti odabrana je najbolje ocijenjena bombonska receptura 75G:25KZ.

4.7.6. *In vitro* digestija u simuliranim uvjetima probavnog sustava

Nakon konzumacije, hrana prolazi probavni sustav, gdje su probavni enzimi u ustima, želucu i tankom crijevu uključeni u razgradnju hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva kako bi isti bili dostupni za apsorpciju kroz crijevnu stijenku. Probava proizvoda može utjecati na strukturne promjene koje utječu na stabilnost i biodostupnost polifenola prisutnih u matrici hrane (Peanparkdee i Iwamoto, 2022).



*IE- bombonski proizvod s inkapsuliranim ekstraktom; LE- bombonski proizvod s liofiliziranim ekstraktom
SSF-puferska otopina za oralnu fazu; SGF-puferska otopina za želučanu fazu; SIF-puferska otopina za intestinalnu fazu

Slika 25. Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava za bombon (75 % gustin i 25 % kuzu) s inkapsulatom

U cilju potvrde važne svrhe inkapsulacije ekstrakta trave ive, provedena je *in vitro* digestija bombona (75 % gustin i 25 % kuzu) s inkapsulatom CMC_KAR i bombona bez inkapsuliranog ekstrakta (umjesto inkapsulata je inkorporiran liofilizirani ekstrakt) pri čemu se otpuštanje hidroksicimetnih kiselina određivalo spektrofotometrijskom metodom. Slika 25 jasno prikazuje postepeno otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz funkcionalnog bombona s maksimumom otpuštanja u crijevnoj fazi (125 min), čime je ostvaren i jedan od važnijih ciljeva inkapsulacije kao potencijalne tehnike za omogućavanje optimiranog otpuštanja aktivnih komponenti u probavnom sustavu. S druge strane, bombon s liofiliziranim ekstraktom maksimum otpuštanja postiže u prve dvije minute gdje je došlo do potpunog otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u oralnom SSF puferu. Peanparkdee i Iwamoto (2022) ističu kako tijekom oralne faze, odnosno pri neutralnom ili blago lužnatom pH i enzimskoj hidrolizi salivarne alfa-amilaze, može doći do degradacije i/ili precipitacije polifenola zbog interakcije proteina sline i polifenola. Primjenom inkapsulacije, odnosno uvođenja određenog polimernog nosača u cilju stvaranja interakcije sa aktivnim tvarima i, posljedično, zaštite od specifičnih uvjeta, navedeni problemi mogu se potencijalno minimizirati. Jednak rezultat zabilježili su Muhammad i sur. (2018) ugrađivši nanočestice cimeta u bijelu čokoladu pri čemu su utvrdili kako je otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsuliranog ekstrakta cimeta bilo sporije nego iz neinkapsuliranog, čime su dokazali kako se inkapsulacijom smanjuje otpuštanje fenolnih spojeva iz čokoladne matrice jer je poboljšana fizikalno-kemijska stabilnost i spriječeno nekontrolirano naglo otpuštanje.

5. ZAKLJUČAK

1. Ekstrakt trave ive pokazao se kao relativno bogat izvor derivata hidroksicimetnih kiselina- feniletanoidnih glikozida.
2. Dobiveni inkapsulati s hidrofobnom karboksimetil celulozom, kao glavnim nosačem, pokazali su bolju prikladnost s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva u odnosu na inkapsulate s arapskom i guar gumom.
3. Primjenom sušenja raspršivanjem postignuta je vrlo visoka inkapsulacijska učinkovitost feniletanoidnih glikozida (90,00-95,00 %), ukupnih polifenola (70,82-98,18 %) i hidroksicimetnih kiselina (68,87-98,88 %), koristeći polimerne nosače arapsku gumu, guar gumu te karboksimetil celulozu samostalno i u kombinacijama.
4. Analizom biorasploživosti polifenolnih spojeva trave ive u *in vitro* uvjetima probavnog sustava, profil otpuštanja bioaktivnih spojeva iz inkapsulata s karboksimetil celulozom pokazuju najbolja zaštitna i stabilizacijska svojstva.
5. Uspješno su razvijeni funkcionalni veganski bomboni s kukuruznim i kuzu škrobom te porcijom bombonskog proizvoda (6 g) može se unijeti $7,74 \pm 1,58$ mg feniletanoidnih glikozida.
6. Senzorski najprihvatljivija formulacija funkcionalnog bombonskog proizvoda s 75 % kukuruznog i 25 % kuzu škroba pokazala je postepeno otpuštanje hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava čime je potvrđena uspješnost tehnike inkapsulacije polifenolnog ekstrakta trave ive, kao i dobar izbor sastojaka u bombonskoj formulaciji.

6. LITERATURA

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH i sur. (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **47**, 4184-4188. <https://doi.org/10.1021/jf990317m>

Ali MR, Mohamed RM, Abdelmaksoud TG (2021) Functional strawberry and red beetroot jelly candies rich in fibers and phenolic compounds. *Pis Sist Syst* **4**, 82-88. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-2-82-88>

Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI (2014) Verbascoside--a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotehmol Adv* **32** (6), 1065-1076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>

Anonymous <http://www.mgflower.altervista.org/teucriummontanum.html> Pristupljeno 05. travnja 2023.

AOAC (1990) Moisture in animal feed – AOAC method 930.15. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P i sur. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotehmol Adv*, **33**(8), 1582-1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.

Belščak-Cvitanović A, Lević S, Kalušević A, Špoljarić I, Đorđević V, Komes D i sur. (2015) Efficiency assessment of natural biopolymers as encapsulants of green tea (*Camellia sinensis* L.) bioactive compounds by spray drying. *Food Bioprocess Technol* **8**, 2444-2460. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1592-y>

Bhandari BR, Datta N, Howes T (1997) Problems associated with spray drying of sugar-rich food. *Dry Techno* **15**(2): 671-684. <https://doi.org/10.1080/07373939708917253>

Bodade RG, Bodade AG (2020) Microencapsulation of bioactive compounds and enzymes for therapeutic applications. U: Pal K, Banerjee I, Sarkar P, Kim D, Deng WP, Dubey NK, Majumder K (ured.), *Biopolymer-Based Formulations*, Elsevier, str. 381-404.

Botrel DA, de Barros Fernandes RV, Borges SV, Yoshida MI (2014) Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Res Int* **62**, 344-352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.003>

Calegari F, Sousa I, Ferreira MGS, Berton MAC, Marino CEB, Tedim J (2022) Influence of the operating conditions on the release of corrosion inhibitors from spray-dried carboxymethylcellulose microspheres. *Appl Sci* **12**. <https://doi.org/10.3390/app12041800>

Cappa C, Lavelli V, Mariotti M (2015) Fruit candies enriched with grape skin powders: Physicochemical properties. *Lwt* **62**, 569-575. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.039>

Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Čustić MH i sur. (2016) Medicinal plants of the family lamiaceae as functional foods-A review. *Czech J Food Sci* **34**, 377-390. <https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS>

Cedeño-Pinos C, Marcucci MC, Bañón S (2021) Contribution of green propolis to the antioxidant, physical, and sensory properties of fruity jelly candies made with sugars or fructans. *Foods* **10**. <https://doi.org/10.3390/foods10112586>

Cedeño-Pinos C, Martínez-Tomé M, Jordán MJ, Bañón S (2023) Revalorisation of Sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl) By-Product Extracts as a Source of Polyphenol Antioxidants for Novel Jelly Candies. *Antioxidants* **12**. <https://doi.org/10.3390/antiox12010159>

Cedeño-Pinos C, Martínez-Tomé M, Murcia MA, Jordán MJ, Bañón S (2020) Assessment of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract as antioxidant in jelly candies made with fructan fibres and Stevia. *Antioxidants* **9**, 1-16. <https://doi.org/10.3390/antiox9121289>

Chew SC, Tan CH, Pui LP, Chong PN, Gunasekaran B, Lin NK (2019) Encapsulation technologies: A tool for functional foods development. *Int J Innov Technol Explor Eng* **8**, 154-160.

Christophe H, Duangjai T (2020) Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: Oxidative stress, aging and age-related diseases. *Medicines* **7**, 26.

Coimbra PPS, Cardoso F de SN, Gonçalves ÉCB de A (2021) Spray-drying wall materials: relationship with bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**, 2809-2826. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1786354>

Correã-Filho LC, Lourenço MM, Moldaõ-Martins M, Alves VD (2019) Microencapsulation of β -Carotene by spray drying: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *Int J Food Sci* **2019**. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>

Costa SS, Machado BAS, Martin AR, Bagnara F, Ragadalli SA, Aline RCA Costa Alves AR (2015) Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. *African J Food Sci* **9**, 462-470. <https://doi.org/10.5897/ajfs2015.1279>

Ćorković I, Pichler A, Buljeta I, Šimunović J, Kopjar M (2021) Carboxymethylcellulose hydrogels: Effect of its different amount on preservation of tart cherry anthocyanins and polyphenols. *Curr Plant Biol* **28**. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100222>

Ćujić-Nikolić N, Stanisavljević N, Šavikin K, Kalušević A, Nedović V, Bigović D i sur. (2018) Application of gum arabic in the production of spray-dried chokeberry polyphenols, microparticles characterisation and digestion method. *Lek sirovine* **38**, 9-16. <https://doi.org/10.5937/leksir1838009c>

DBMR (2022) Global Candy Market – Industry Trends and Forecast to 2029, June 2022. DBMR- Data Bridge Market Research, <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-candy-market>. Pristupljeno 26. srpnja 2023.

Delgado P, Bañón S (2015) Determining the minimum drying time of gummy confections based on their mechanical properties. *CYTA - J Food* **13**, 329-335. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.974676>

Díaz-Montes E (2023) Wall materials for encapsulating bioactive compounds via spray-drying : A review. *Polymers* **15**, 2659. <https://doi.org/10.3390/polym15122659>

Đorđević V, Paraskevopoulou A, Mantzouridou F, Lalou S, Pantić M, Bugarski B, i sur. (2016) Encapsulation technologies for food industry. U: Nedović V, Raspor P, Lević J, Tumvas Šaponjac V, Barbosa-Cánovas G (ured.) Emerging and traditional technologies for

safe, healthy and quality food (online), Springer, Cham, str. 329-382. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24040-4_18. Pristupljeno 01. srpnja 2023.

Eghbal N, Liao W, Dumas E, Azabou S, Dantigny P, Gharsallaoui A (2022) Microencapsulation of natural food antimicrobials: Methods and applications. *Appl Sci* **12**. <https://doi.org/10.3390/app12083837>

Ghendov-Mosanu A, Cristea E, Sturza R, Niculaua M, Patras A (2020) Synthetic dye's substitution with chokeberry extract in jelly candies. *J Food Sci Technol* **57**, 4383-4394. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04475-6>

Gok S, Toker OS, Palabiyik I, Konar N (2020) Usage possibility of mannitol and soluble wheat fiber in low calorie gummy candies. *LWT* **128**, 109531. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109531>

Goldoni L (2004) Tehnologija konditorskih proizvoda-bombonski proizvodi. Kugler, Zagreb, str. 261-292.

Goula AM, Adamopoulos KG (2004) Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. *J Food Eng* **66**, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.031>

GVR (2022) Vegan Confectionery Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Chocolate, Sugar, Flour), by Distribution Channel (Online, Offline), by Region, and Segment Forecasts, 2022-2030, April 2022. GVR-Grand View Research, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/vegan-confectionery-market>. Pristupljeno 26. srpnja 2023.

Huang J, Zhao D, Cui C, Hao J, Zhang Z, Guo L (2022) Research progress and trends of phenylethanoid glycoside delivery systems. *Foods* **11** (5), 769. <https://doi.org/10.3390/foods11050769>

Kalušević AM, Lević SM, Čalija BR, Milić JR, Pavlović VB, Bugarski BM i sur. (2017) Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract. *J Food Sci Technol* **54**, 3411-3420. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2790-6>

Kalyankar SD, Deshmukh MA, Chopde SS, Khedkar CD, Lule VK, Deosarkar SS (2016) Milk Powder. U: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (ured), Encyclopedia of Food and Health (online), Academic Press, Oxford, str. 724-728. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00465-7>

Kamthai S, Magaraphan R (2017) Mechanical and barrier properties of spray dried carboxymethyl cellulose (CMC) film from bleached bagasse pulp. *Ind Crops Prod* **109**, 753-761. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.040>

Kaur R, Gupta TB, Bronlund J, Kaur L (2021) The potential of rosemary as a functional ingredient for meat products- a review. *Food Rev Int*, 1-21 <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1950173>

Kłosowska A, Wawrzyńczak A, Feliczak-Guzik A (2023) Microencapsulation as a Route for Obtaining Encapsulated Flavors and Fragrances. *Cosmetics* **10**, 1-18. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010026>

Lazghab M, Saleh K, Pezron I, Guigon P, Komunjer L (2005) Wettability assessment of finely divided solids. *Powder Technol* **157**, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.05.014>

Le Bourvellec C, Renard CMGC (2012) Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr* **52**, 213-248. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808>

Liao M, Ma L, Miao S, Hu X, Liao X, Chen F i sur. (2021) The in-vitro digestion behaviors of milk proteins acting as wall materials in spray-dried microparticles: Effects on the release of loaded blueberry anthocyanins. *Food Hydrocoll* **115**, 106620. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106620>

Lu W, Yang X, Shen J, Li Z, Tan S, Liu W i sur. (2021) Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technol* **394**, 562-574. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.082>

Lukasiewicz SJ (1989) Spray-Drying Ceramic Powders. *J Am Ceram Soc* **72**, 617-624. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1989.tb06184.x>

Mandura A, Šeremet D, Ščetar M, Vojvodić Cebin A, Belščak-Cvitanović A, Komes D (2020) Physico-chemical, bioactive, and sensory assessment of white tea-based candies during 4-months storage. *J Food Process Preserv* **44**, 1-14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14628>

Marín-Peñalver D, Alemán A, Montero MP, Gómez-Guillén MC (2021) Entrapment of natural compounds in spray-dried and heat-dried iota-carrageenan matrices as functional ingredients in surimi gels. *Food Funct* **12**, 2137-2147. <https://doi.org/10.1039/D0FO02922J>

Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J Med Plants Res* **2**: 321-330.

Mazid M, Khan TA, Mohammad F (2011) Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol Med* **3**, 232-249.

Mihailović V, Katanić Stanković JS, Mihailović N (2020) Phenolic compounds diversity of *Teucrium* species. U: Stanković M (ured.) *Teucrium* Species: Biology and applications (online), Springer, Cham, str. 143-179. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-52159-2>.
Pristupljeno 05. travnja 2023.

Milián YE, Gutiérrez A, Grágeda M, Ushak S (2017) A review on encapsulation techniques for inorganic phase change materials and the influence on their thermophysical properties. *Renew Sustain Energy Rev* **73**, 983-999. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.159>

Milošević-Djordjević O, Stošić I, Stanković M, Grujičić D (2013) Comparative study of genotoxicity and antimutagenicity of methanolic extracts from *Teucrium chamaedrys* and *Teucrium montanum* in human lymphocytes using micronucleus assay. *Cytotechnology* **65**, 863-869. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9527-1>

Mitreski I, Stanoeva JP, Stefova M, Stefkov G, Kulevanova S (2014) Polyphenols in representative *Teucrium* species in the flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSn profile and content. *Nat Prod Commun* **9**, 175-180. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900211>

- Muhammad DRA, Saputro AD, Rottiers H, Van de Walle D, Dewettinck K (2018) Physicochemical properties and antioxidant activities of chocolates enriched with engineered cinnamon nanoparticles. *Eur Food Res Technol* **244**, 1185-1202. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3035-2>
- Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Morais S, Barroso MF, Moreira MM (2018) Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J Supercrit Fluids* **138**, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.019>
- Ngwuluka NC, Abu-Thabit NY, Uwaezuoke OJ, Erebor JO, Ilomuanya MO, Mohamed RR i sur. (2020) Natural Polymers in Micro- and Nanoencapsulation for Therapeutic and Diagnostic Applications: Part I: Lipids and Fabrication Techniques. U: Abu-Thabit N (ured.) Nano- and Microencapsulation (online), IntechOpen, London. Pristupljeno 01. srpnja 2023.
- Nieto G (2017) Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines* **4**, 63. <https://doi.org/10.3390/medicines4030063>
- Noor-E-Tabassum, Das R, Lami MS, Chakraborty AJ, Mitra S, Tallei TE i sur. (2022) Ginkgo biloba: A treasure of functional phytochemicals with multimedicinal applications. *Evidence-based Complement Altern Med* **2022**. <https://doi.org/10.1155/2022/8288818>
- Ogrodowska D, Tańska M, Brandt W (2017) The influence of drying process conditions on the physical properties, bioactive compounds and stability of encapsulated pumpkin seed oil. *Food Bioprocess Technol* **10**, str. 1265-1280. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1898-z>
- Ough CS, Aerine MA (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc., New York, str. 196-221.
- Paulo F, Santos L (2017) Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Mater Sci Eng C* **77**, 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
- Peanparkdee M, Iwamoto S (2022) Encapsulation for improving in vitro gastrointestinal digestion of plant polyphenols and their applications in food products. *Food Rev Int* **38**, 335-353. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733595>
- Petrovska BB (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* **6**, 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>

Pravilnik (2005) Pravilnik o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima. Narodne novine 73, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1442.html. Pristupljeno 02. srpnja 2023.

Puch N, Bobadilla M, Boutin B (2019) Advancements in gummies. *Manuf Confect*, 67-75.

Radulović N, Dekić M, Josković M, Vukićević R (2012) Chemotaxonomy of Serbian *Teucrium* Species Inferred from Essential Oil Chemical Composition: the Case of *Teucrium scordium* L. ssp. *scordioides*. *Chem Biodivers* 9, 106-122. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100204>

Rehman Fur, Kalsoom M, Adnan M, Fazeli-Nasab B, Naz N, Ilahi H, i sur. (2021) Importance of medicinal plants in human and plant pathology: A Review. *Int J Pharm Biomed Res* 8, 1-11. <https://doi.org/10.18782/2394-3726.1110>

Şahin Nadeem H, Dincer C, Torun M, Topus A, Özdemir F (2013) Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT-Food Science and Technology* 52, 31-38.

Santos D, Maurício AC, Sencadas V, Santos JD, Fernandes MH, Gomes PS (2017) Spray Drying: An Overview. U: Pignatello R i Musumeci T (ured.) *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition* (online), IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69128>. Pristupljeno 01. srpnja 2023.

Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J Funct Foods* 18, 820-897. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.018>

Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol* 78, 34-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>

Silveira ACP, Perrone IP, Junior PHR, Carvalho AF (2013) Secagem por Spray: uma revisão. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes* 68 (391), 51-58.

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Meth Enzymol* **299**, 1179.

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

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

Sosnik A, Seremeta KP (2015) Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci* **223**, 40-54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>

Stanković M (2020) *Teucrium* species: Biology and applications (online), Springer, Cham, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-52159-2>. Pristupljeno 05. travnja 2023.

Šeremet D, Mandura A, Cebin AV, Martinić A, Galić K, Komes D (2020) Challenges in confectionery industry: Development and storage stability of innovative white tea-based candies. *J Food Sci* **85**, 2060-2068. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15306>

Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L (2012) Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. U: Henry J (ured.) *Advances in Food and Nutrition Research* (online). Academic Press Inc., str. 75-139. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00003-4>

Tarahi M, Mohamadzade Fakh-davood M, Ghaedrahmati S, Roshanak S, Shahidi F (2023) Physicochemical and sensory properties of vegan gummy candies enriched with high-fiber jaban watermelon exocarp powder. *Foods* **12**. <https://doi.org/10.3390/foods12071478>

Tezuka Y, Tsuchiya Y, Shiomi T (1996) ¹³C NMR determination of substituent distribution in carboxymethylcellulose by use of its presterified derivatives. *Carbohydr Res* **291**, 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00163-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00163-2)

Tian XY, Li MX, Lin T, Qiu Y, Zhu YT, Li XL i sur. (2021) A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *Eur J Med Chem* **209**. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112563>

Timilsena YP, Haque MA, Adhikari B (2020) Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food Nutr Sci* **11**, 481-508. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.116035>

Tripathi J, Ambolikar R, Gupta S (2022) Methylated radiation depolymerized guar gum- a novel wall material for flavour encapsulation. *Food Chem Adv* **1**, 100102. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100102>

Trojanowska A, Nogalska A, Valls RG, Giamberini M i Tylkowski B (2017) Technological solutions for encapsulation. *Phys Sci Rev* **2**, 9. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0020>

Tu P, Song Z, Lei L (2005) Medicinal preparation containing phenylethanoid glycosides extracted from *Cistanche tubulosa*. EP 1 498 131 A1

Tumbas VT, Mandic AI, Cetkovic GS, Djilas SM, Canadanovic-Brunet JM (2004) HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum L*) extracts. *Acta Period Technol* **280**, 265-273. <https://doi.org/10.2298/apt0435265t>

Vargas-Muñoz DP, Kurozawa LE (2020) Influence of combined hydrolyzed collagen and maltodextrin as carrier agents in spray drying of cocona pulp TT - Influência da mistura de colágeno hidrolizado e maltodextrina como agentes carreadores na secagem por atomização de polpa de cocona. *Brazilian J Food Technol* **23**, 1-15. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.25419>

Vijeth S, Heggannavar GB, Kariduraganavar MY (2019) Encapsulating wall materials for micro-/nanocapsules. u: Salaün F (ured.) Microencapsulation - processes, technologies and industrial applications (online), IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82014>. Pristupljeno 01. srpnja 2023.

Wandrey C, Bartkowiak A, Harding SE (2010) U: Zuidam NJ i Nedović VA (ured.) Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing (online), Springer, New York, str. 31-101. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>.

Waraczewski R, Muszyński S, Sołowiej BG (2022) An analysis of the plant- and animal-based hydrocolloids as byproducts of the food industry. *Molecules* **27**. <https://doi.org/10.3390/molecules27248686>

Yadav R, Agarwala M (2011) Phytochemical analysis of some medicinal plants. *J Phytol* **3**, 10-14.

Zhu M, Lu C, Li W (2013) Transient exposure to echinacoside is sufficient to activate Trk signaling and protect neuronal cells from rotenone. *J Neurochem* **124**, 571-580.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12103>

Ziyatdinova G, Kalmykova A (2023) Electrochemical characterization of the antioxidant properties of medicinal plants and products: A review. *Molecules* **28**(5), 2308.
<https://doi.org/10.3390/molecules28052308>

Zlatić NM, Stanković MS (2019) Effects of calcareous and serpentinite parent material on the mineral characteristics of soils and plant material of *Teucrium montanum* L. (Lamiaceae). *Environ Monit Assess* **191**. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7750-3>

Zuidam NJ, Shimoni E (2010) Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. U: Zuidam NJ i Nedović VA (ured.) Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing (online), Springer, New York, str. 3-31.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Vlastoručni potpis