

Kinetika degradacije fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lišća lovora (*Laurus nobilis* L.) tijekom toplinske obrade

Kolanović, David

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:159:922358>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

David Kolanović

**KINETIKA DEGRADACIJE
FENOLNIH SPOJEVA U
PRAHOVIMA EKSTRAKTA LIŠĆA
LOVORA (*Laurus nobilis* L.)
TIJEKOM TOPLINSKE OBRADE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zorana Zorića te uz pomoć Erike Dobroslavić, mag.ing.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. - 2020. Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.



Europska unija
Zajedno do fondova EU



Ministarstvo
znanosti i obrazovanja



Ministarstvo
regionalnoga razvoja i
fondova Europske unije



EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDOVI



Operativni program
KONKURENTNOST
I KOHEZIJA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

KINETIKA DEGRADACIJE FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA LIŠĆA LOVORA (*Laurus nobilis* L.) TIJEKOM TOPLINSKE OBRADU

David Kolanović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058209244

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj temperature, vremena toplinskog tretmana, upotrebe različitih nosača i njihovih kombinacija prilikom inkapsulacije fenolnih spojeva lišća lovora sušenjem raspršivanjem, na degradaciju fenolnih spojeva i pripadajuće kinetičke parametre te antioksidacijski kapacitet. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je HPLC UV/Vis PDA analizom te su identificirani i kvantificirani fenolni spojevi podijeljeni u 4 grupe: pro(anto)cijanidini, flavan-3-oli, fenolne kiseline i flavonol-glikozidi. Antioksidacijski kapacitet određen je spektrofotometrijski pomoću DPPH i ABTS metode. Degradacija fenolnih spojeva slijedi kinetiku prvog reda te se pokazalo da su flavan-3-oli najnestabilnija grupa spojeva. Flavonol-glikozidi pokazali su se kao najstabilnija grupa polifenola kada se kao nosač koristio β -CD te β -CD:MD, dok su kod nosača β -CD:GA to bili proantocijanidini. Pokazalo se da što je veća temperatura i duže vrijeme toplinskog tretmana, to je veća degradacija fenolnih spojeva. Antioksidacijski kapacitet prahova bio je relativno stabilan tijekom cijelog toplinskog tretmana.

Ključne riječi: *kinetika degradacije, fenolni spojevi, sušenje raspršivanjem, toplinska obrada, lišće lovora*

Rad sadrži: 55 stranica, 14 slika, 10 tablica, 82 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić

Pomoć pri izradi: Erika Dobrosravić, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu

1. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić (mentor)
3. doc. dr. sc. Maja Repajić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

KINETICS OF DEGRADATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BAY LEAF (*Laurus nobilis* L.)
EXTRACT POWDERS DURING HEAT TREATMENT

David Kolanović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058209244

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of temperature, heat treatment time, the use of different carriers and their combinations during the encapsulation of phenolic compounds of bay leaves by spray drying, on the degradation of phenolic compounds and associated kinetic parameters and antioxidant capacity. Identification and quantification of phenolic compounds was carried out by HPLC UV/Vis PDA analysis. The antioxidant capacity was determined spectrophotometrically using the DPPH and ABTS method. Flavan-3-ols have been shown to be the most unstable group of compounds. Flavonol-glycosides, and proanthocyanidins proved to be the most stable group of polyphenols when β -CD, β -CD:MD, and β -CD:GA were used as carriers, respectively. It was shown that the higher the temperature and the longer the heat treatment time, the greater the degradation of phenolic compounds. The antioxidant capacity of the powders was relatively stable during the entire heat treatment.

Keywords: *kinetics of degradation, phenolic compounds, spray drying, heat treatment, bay leaves*

Thesis contains: 55 pages, 14 figures, 10 tables, 82 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Zoran Zorić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Erika Dobroslavčić, MSc Research Assistant

Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (president)
2. Zoran Zorić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (member)
4. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 25th, 2023

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. LOVOR (<i>Laurus nobilis</i> L.) | 2 |
| 2.1.1. Porijeklo i botanički opis..... | 2 |
| 2.1.2. Upotreba i zdravstvene dobrobiti..... | 3 |
| 2.2. FENOLNI SASTAV LOVORA | 4 |
| 2.2.1. Osnovne karakteristike i klasifikacija polifenola | 4 |
| 2.2.2. Kemijski sastav lista lovora..... | 7 |
| 2.3. INKAPSULACIJA BILJNIH EKSTRAKATA | 8 |
| 2.3.1. Nosači koji se koriste u mikro- i nano-inkapsulaciji | 9 |
| 2.3.2. Sušenje raspršivanjem..... | 11 |
| 2.4. STABILNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA | 12 |
| 2.4.1. Utjecaj inkapsulacije na stabilnost bioaktivnih spojeva | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 14 |
| 3.1. MATERIJALI | 14 |
| 3.1.1. Uzorci lovora | 14 |
| 3.1.2. Kemikalije | 14 |
| 3.1.3. Aparatura | 15 |
| 3.1.4. Pribor..... | 15 |
| 3.2. METODE RADA | 16 |
| 3.2.1. MAE polifenola iz lišća lovora..... | 16 |
| 3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari | 17 |
| 3.2.3. Proizvodnja praha ekstrakta lišća lovora primjenom sušenja raspršivanjem | 17 |
| 3.2.4. Tretiranje prahova pri povišenim temperaturama | 19 |
| 3.2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva..... | 20 |
| 3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/Vis PDA detekciju | 21 |
| 3.2.6.1. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva | 22 |
| 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom..... | 23 |
| 3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom..... | 25 |
| 3.2.9. Obrada podataka | 27 |
| 3.2.9.1. Statistička analiza podataka..... | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 29 |
| 4.1. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA U | |

| | |
|---|-----------|
| PRAHOVIMA EKSTRAKTA LOVORA | 29 |
| 4.2. KINETIČKI PARAMETRI TOPLINSKE DEGRADACIJE FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA LOVORA | 31 |
| 4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET PRAHOVA EKSTRAKTA LOVORA – DPPH I ABTS METODA..... | 39 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 45 |
| 6. LITERATURA..... | 46 |

1. UVOD

U posljednje vrijeme sve je veći interes za fenolne spojeve, odnosno polifenole, biljne metabolite s izrazitim bioaktivnim potencijalom. Njihova bioaktivnost očituje se na različite načine, a najznačajniji primjeri su antioksidacijsko, mikrobiocidno te konzervirajuće djelovanje.

Hrvatska obala i otoci bogati su samoniklim biljem koje je vrlo ljekovito te se od davnina tradicionalno rabi za liječenje i ublažavanje mnogih tegoba. Neke od značajnijih samoniklih biljaka na hrvatskom području su lovor, mirta, tršlja, rogač, kadulja i trnina. Njihovo terapijsko djelovanje izravna je posljedica njihovog sadržaja bioaktivnih molekula, uključujući i polifenole.

Kada se istraži i prouči kemijski profil ovog bilja, vidi se da je tu prisutan bioaktivni potencijal te na taj način tradicionalne iskustvene primjene ovog bilja dobivaju i znanstvenu podlogu. Znanstvenici nastoje iskoristiti ovaj bioaktivni potencijal te razviti i nove proizvode na bazi ovog bilja kao što su to primjerice razni dodatci prehrani ili kozmetički proizvodi. To potencijalno može biti ostvareno izolacijom bioaktivnih molekula iz bilja te njihovom stabilizacijom koristeći prikladne tehnike kao npr. inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem. Važno je istražiti i poznavati kako se ove bioaktivne molekule ponašaju pri različitim oblicima procesiranja i skladištenja te izlaganja okolišnim uvjetima.

Cilj ovog istraživanja bio je ekstrahirati fenolne spojeve iz lišća lovora te ih inkapsulirati pomoću različitih nosača u prahove i istražiti utjecaj temperature, vremena toplinskog tretmana, upotrebe različitih nosača i njihovih kombinacija na degradaciju fenolnih spojeva i pripadajuće kinetičke parametre te antioksidacijsku aktivnost. Inkapsulacija je provedena sušenjem raspršivanjem, a toplinska obrada provedena je u laboratorijskom sušioniku. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je HPLC analizom, dok je antioksidacijska aktivnost određena DPPH i ABTS metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LOVOR (*Laurus nobilis* L.)

2.1.1. Porijeklo i botanički opis

Lovor (*Laurus nobilis* L.) (slika 1) zimzeleni je višegodišnji grm koji pripada obitelji *Lauraceae*. Koristi se tisućama godina i neizostavan je sastojak u kuhanju i mnogim tradicionalnim jelima. Sorte roda *Laurus* porijeklom su iz južnog Sredozemnog područja, supropa i tropa istočne Azije, Južne i Sjeverne Amerike, Balkana i Male Azije. Velika varijabilnost među vrstama uvelike se pripisuje neizvjesnosti točnog broja vrsta. Varijabilnost se očituje u morfologiji, boji cvijeta, staništu rasta, listovima, stabljiki, i kemijskom sastavu (Batool i sur., 2020).

Lovor je višegranati grm visine do 6-8 m i promjera do 15-40 cm s glatkom, tankom i smeđom korom sa sjenovitom krošnjom. Listovi su naizmjenični, lancetasti i dvoperasti spojevi, s glatkim ili oštrim rubovima dugi 29-30 cm koji sadrže 24 lancetasta listića, dugih 4,8 - 4,9 cm i širokih 1,7 - 1,8 cm s 0,5 cm dugom peteljkom (Patrakar i sur., 2012).



Slika 1. Suho lišće lovora (*Laurus nobilis* L.) (vlastita fotografija)

2.1.2. Upotreba i zdravstvene dobrobiti

Lovor se konzumira na razne načine i u razne svrhe. Osim svježeg lišća, drugi uobičajeni prerađeni oblici lovora uključuju cijelo suho lišće, zamrznuto lišće, lišće u prahu i ekstrahirana eterična ulja. Destilacija vodenom parom najbolja je metoda za dobivanje eteričnih ulja iz lovora. Za sušenje lovorovog lista dostupni su različiti načini sušenja. Tradicionalno se suši na otvorenom 10-12 dana. Sušenje na suncu ima neke nedostatke, poput prirodnog gubitka boje i gubitka eteričnog ulja koji rezultiraju niskom tržišnom vrijednošću lovorovog lista. Sušenje vrućim zrakom pri 60 °C najbolja je metoda za proizvodnju suhog lovorovog lišća (Bozan i Karakaplan, 2007).

Poznato je da se lovor navelike koristi u kulinarstvu, u širokom rasponu jela, umaka i začina. Upotpunjuje okus jela pa se koristi u juhama, varivima i nadjevima, kao i u ribi, mesu, povrću, umacima, kiselim krastavcima i kobasicama. Lako se miješa s mnogim drugim biljem kao što su češnjak, senf, papar, peršin, ružmarin, majčina dušica i origano. Lovor također može biti važan sastojak čajeva, ulja, sireva i likera, a njegovo se eterično ulje koristi u kozmetičkoj industriji za sapune, parfeme, gotovu hranu, pića i dentalne proizvode (Batoool i sur., 2020).

Mnoge biljke i začini značajno pridonose zdravlju unatoč maloj konzumaciji, jer su puni antioksidansa i određenih minerala. Nije jasno koliko se lovora mora konzumirati da bi se dobile njegove zdravstvene dobrobiti. Istraživači nemaju posebne preporuke o određenoj količini konzumacije. Ipak, lovor je pun antioksidansa i dobar je izvor minerala i dijetalnih vlakana. Čaj od lovora koristi se za liječenje želučanih bolova, čišćenje sluzi u plućima, prehladu i grlobolju. Listovi se koriste za liječenje kožnih osipa, bolova u uhu, groznice, anemije. Oblog od lovorovog lista koristi se za liječenje reumatizma i neuralgije. Za liječenje glavobolje, list lovora drži se u nosnici ili ispod trake za glavu kako bi se ublažila ova bol. Tradicionalno se koristio i za liječenje gastrointestinalnih problema kao što su mučnina, povraćanje, poremećena probava, dijareja, flatulencija, eruktacija i nadutost u epigastriju te se koristio kao diuretik i ima mnoge analgetske učinke (Batoool i sur., 2020; Elmastaş i sur., 2006).

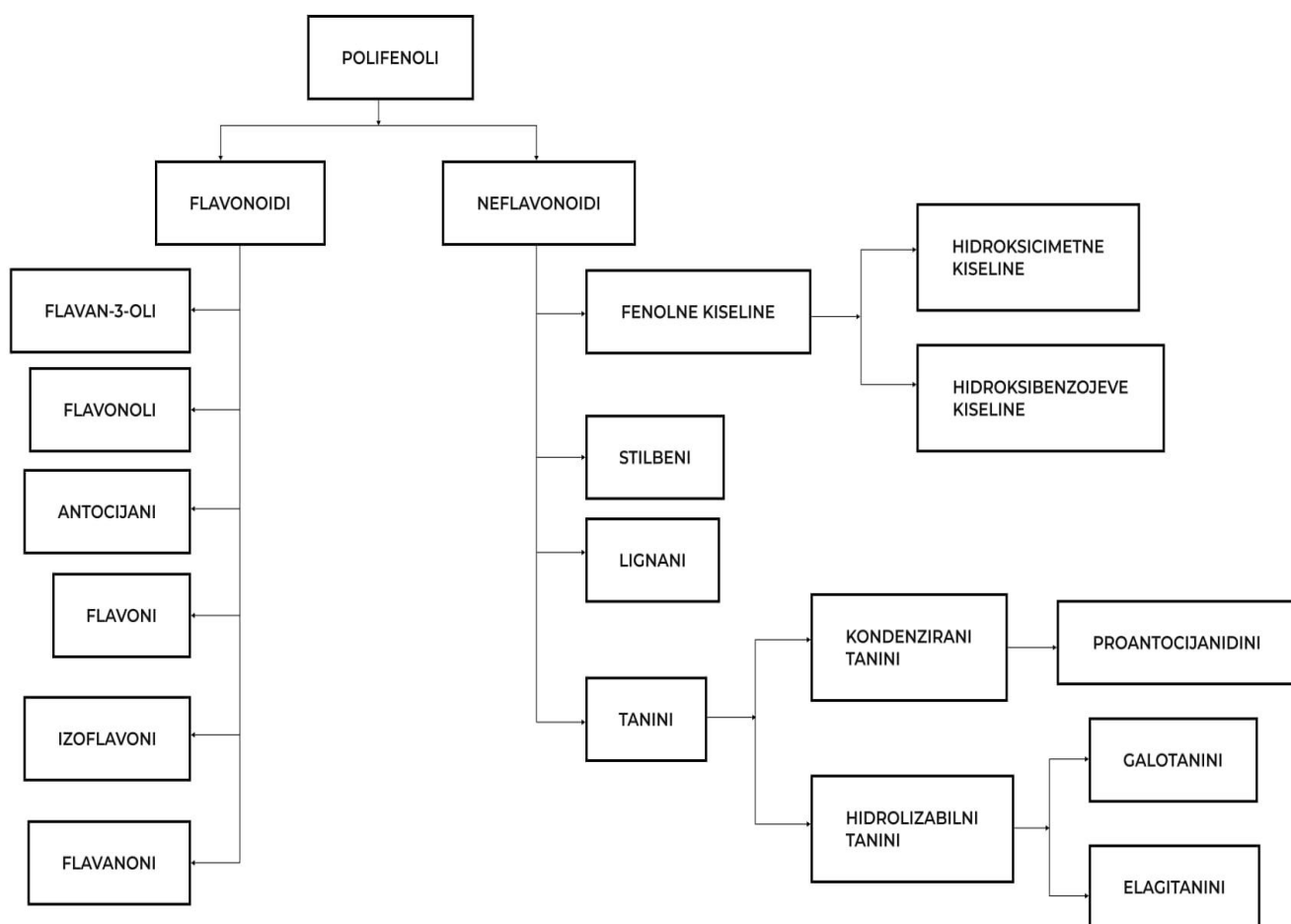
Lovor se pokazao učinkovitim protiv mnogih infekcija uzrokovanih gljivicama, virusima, bakterijama i protozoama, a također pomaže u inhibiciji rasta kancerogenih stanica. Listovi lovora pomažu i kod gripe, bronhitisa, astme, kašlja, prehlade, snižavanja razine kolesterola u krvi i vodenih kozica. Sok od lovora učinkovit je lijek za bolne oči i noćno sljepilo, koje je općenito uzrokovano manjkom vitamina A (Batoool i sur., 2020).

2.2. FENOLNI SASTAV LOVORA

2.2.1. Osnovne karakteristike i klasifikacija polifenola

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti s jednim ili više aromatskih prstenova i dvije ili više hidroksilnih skupina. Naširoko se nalaze u korijenju, stabljici, lišću, cvijeću, plodovima i sjemenu biljaka (de Paulo Farias i sur., 2021). U gotovo svim ljekovitim i jestivim biljkama identificirano je oko 8000 fenolnih spojeva (Sun i sur, 2020). Različite studije pokazale su da je prehrana s polifenolima usko povezana sa smanjenjem rizika od kroničnih bolesti. Polifenoli su bioaktivni spojevi a njihova bioaktivnost među ostalim obuhvaća antioksidacijsko djelovanje, protuupalno djelovanje, antikancerogeno djelovanje, antimikrobno djelovanje, neurozaštitno djelovanje (Li i sur., 2023; Wan i sur., 2021). U posljednje vrijeme polifenoli privlače pažnju znanstvenika zbog njihove potencijalne uloge kao funkcionalni sastojci hrane za izradu nutraceutika i funkcionalne hrane.

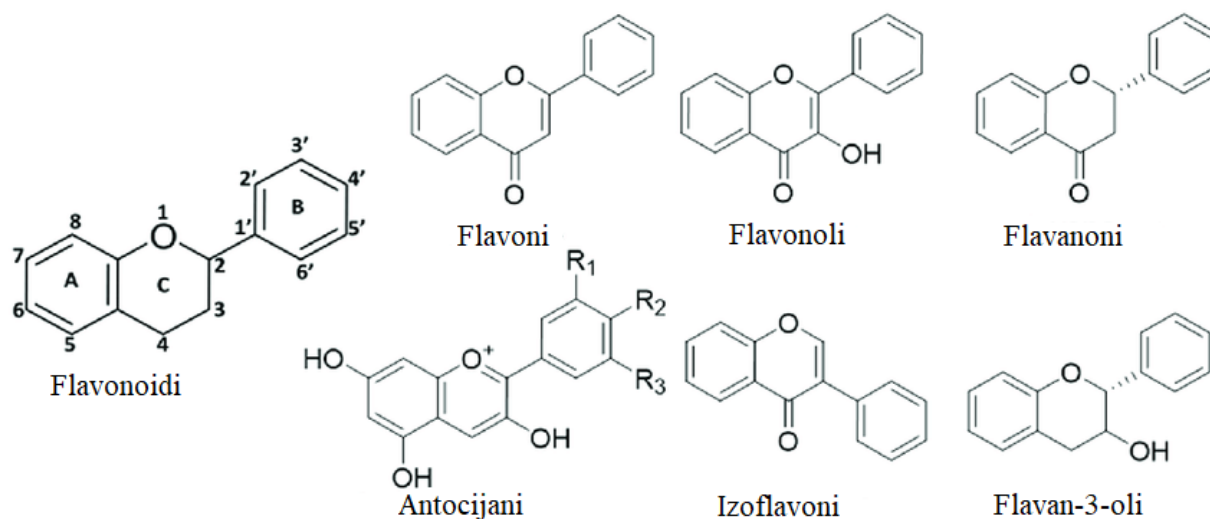
Prema svojoj kemijskoj strukturi, polifenoli se klasificiraju u 2 glavne klase, a to su flavonoidi i neflavonoidi (slika 2). Flavonoidi se dijele na flavan-3-ole, flavonole, antocijane, flavone, izoflavone i flavanone (slika 3). Neflavonoidi se dijele na fenolne kiseline, lignane, stilbene i tanine. Fenolne kiseline se dalje dijele na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (slika 4). Tanini se dijele na kondenzirane (proantocijanidini) i hidrolizabilne tanine (galotanini, elagitanini) (Li i sur., 2023).



Slika 2. Klasifikacija polifenola (prema Li i sur., 2023)

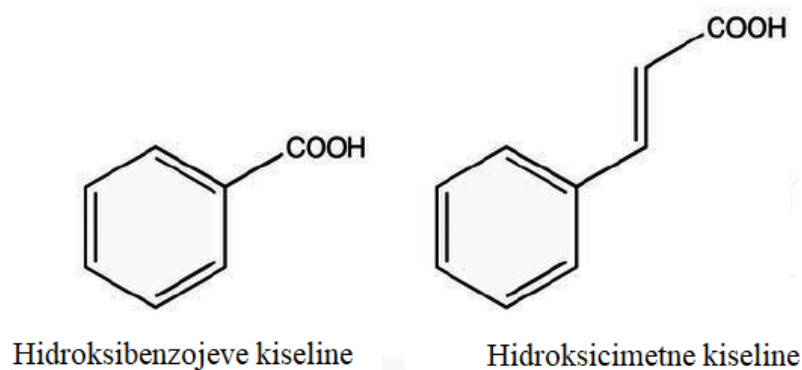
Osnovna kemijska struktura flavonoida je strukturalni kostur C₆-C₃-C₆ (slika 3), koji se sastoji od dva benzenska prstena povezana preko trećeg heterocikličkog pirenskog prstena koji sadrži kisik. Uobičajeni oblici flavonoida su aglikoni, glikozidi te acetilirani, metilirani, prenilirani i sulfatirani derivati (Bie i sur., 2023).

Pro(anto)cijanidini se sastoje od polimera i oligomera podjedinica polihidroksi flavan-3-ola i polihidroksi flavan-4-ola. Procijanidini se dijele na A-tip i B-tip. Postoje dvostruke veze (C-C i C-O veza) u procijanidinima A-tipa (procijanidin A1-A2), dok se procijanidini B-tipa sastoje od interflavanolnih veza formiranih između C₄-C₆ i C₄-C₈ različitih jedinica flavanola (Farha i sur., 2020).



Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavonoida i njihovih podklasa (prema Siddiqui i sur., 2020)

Fenolne kiseline imaju samo jedan fenolni prsten i to su aromatske karboksilne kiseline s hidroksilnim derivatima koje se u biljci uglavnom spajaju s organskim tvarima (glikozidima, amidima, esterima, itd.). Fenolne kiseline mogu uzrokovati donaciju H-atoma zbog svoje fenolne skupine i rezonantno stabilizirane strukture, te stoga pokazuju antioksidacijsku aktivnost mehanizmom hvatanja radikala, donacijom elektrona ili jednostrukim gašenjem kisika (Li i sur., 2023; Robbins, 2003).



Slika 4. Osnovna kemijska struktura hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina (prema Khoddami i sur., 2013)

2.2.2. Kemijski sastav lista lovora

Suhi list lovora sadrži 50 % ugljikohidrata, 25 % sirovih vlakana, 9 % ulja i 7 % proteina. Sadrži i vitamine B skupine, minerale, askorbinsku kiselinu, a kao važan konstituent ističe se i esencijalno ulje (Attokaran, 2017).

Prema Alejo-Armiju i sur. (2017) neki od sastojaka koji se nalaze u lišću lovora su polifenolni spojevi, alkaloidi, norizoprenoidi, šećeri, polisaharidi, organske kiseline i tokoferoli. Lišće također sadrži hlapljiva ulja koja se nakupljaju u palisadnim i mezofilnim stanicama i prisutna su u postotku od 1- 3% na bazi svježih mase (Özcan i Chalchat, 2005). Glavni kemijski spoj od oko 150 identificiranih pomoću GC-MS u eteričnom ulju obično je 1,8-cineol s udjelom do 50 %, pa čak i 70 % (Konovalov i Alieva, 2019; Alejo-Armijo, 2017; Díaz-Maroto, 2002). Lišće također sadrži mali udio fiksiranih ulja s 25 identificiranih masnih kiselina s razinama višestruko nezasićenih (PUFA) masnih kiselina višim od zasićenih masnih kiselina (SFA) i razinama omega-3 masnih kiselina višim od omega-6 masnih kiselina, što se smatra poželjnim za ljudsku prehranu (Dias i sur., 2014). Seskviterpenski laktoni također predstavljaju karakterističnu skupinu fitokemikalija prisutnih u listovima lovora (Dobrosravić i sur., 2022).

U istraživanju Dobrosravić i sur. (2021) karakteriziran je polifenolni profil ekstrakata lišća lovora dobivenih pomoću 3 metoda ekstrakcije: mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (eng. *microwave-assisted extraction, MAE*), ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (eng. *ultrasound-assisted extraction, UAE*), konvencionalna ekstrakcija toplinskim refluksom (eng. *conventional heat-reflux extraction, CRE*). Identifikacija i kvantifikacija polifenola provedena je UPLC/MS-MS analizom. U ekstraktima dobivenim svim trima ekstrakcijskim metodama, identificirano je ukupno 29 fenolnih spojeva koji pripadaju u skupine fenolnih kiselina, flavonola, flavan-3-ola, flavona i proantocijanidina (tablica 1).

Tablica 1. Polifenolni spojevi lišća lovora (*prema Dobrosravić i sur., 2021*)

| Fenolne kiseline | Flavonoli | Flavan-3-oli | Flavoni | Proantocijanidini |
|---|--|-------------------------|--|------------------------|
| ružmarinska kiselina | kamferol-3- <i>O</i> - deoksiheksozid | epikatehin | luteolin-6- <i>C</i> - glukozid | procijanidin trimer |
| siringinska kiselina | rutin | katehin | apigenin | |
| 3,4- dihidrobenzojeva kiselina heksozid | kvercetin-3- glukozid | epikatehin galat | luteolin | |
| protokatehinska kiselina | kamferol-3- rutinozid | epigalokatehin galat | apigenin-6- <i>C</i> - (<i>O</i> - deoksiheksozil)- heksozid | |
| klorogenska kiselina | kvercetin-3- pentozid | | | |
| <i>p</i> - hidroksibenzojeva kiselina | kamferol-3- <i>O</i> - heksozid | | | |
| kafeinska kiselina | izoramnetin-3- heksozid | | | |
| <i>p</i> -kumarinska kiselina | kvercetin-3- ramnozid | | | |
| ferulinska kiselina | kamferol-3- <i>O</i> - pentozid | | | |
| galna kiselina | miricetin | | | |

2.3. INKAPSULACIJA BILJNIH EKSTRAKATA

Inkapsulacija je proces u kojem se aktivni agensi zatvaraju ili oblažu materijalom nosača kako bi se formirale čestice ili kapsule u mikrometarskoj ili nanometarskoj skali. Obloženi materijali (aktivna tvar) također se označavaju kao jezgra, ispunja ili unutarnja faza, dok su

materijali za oblaganje (noseći materijal) poznati kao materijal stijenke, membrana, kapsula, ljuska, matrica ili vanjska faza. Tehnologija inkapsulacije opsežno se primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji za kapsuliranje bioaktivnih spojeva (polifenoli, mikronutrijenti, enzimi i antioksidansi) stvaranjem zaštitnih barijera protiv svjetla, kisika, pH, vlage, topline, smicanja ili drugih ekstremnih uvjeta (Devi i sur., 2017).

U gotovoj primjeni, inkapsulacija povećava bioraspoloživost, kontrolirano oslobađanje, i preciznost ciljanja bioaktivnih spojeva. Nadalje, inkapsulacija doprinosi maskiranju nepoželjnih okusa, stvaranju čvrstih čestica, smanjenju isparavanja ili gubitku hlapljivosti, poboljšanju reaktivne barijere za bioaktivne spojeve i poboljšanju fizičke stabilnosti, biološke aktivnosti i roka trajanja bioaktivnih spojeva (de Souza Simões i sur., 2017; Aguiar i sur., 2016; Jia i sur., 2016). Stoga, inkapsulacija igra važnu ulogu u očuvanju i poboljšanju funkcionalnosti bioaktivnih spojeva.

Mikrokapsulacija i nanokapsulacija tehnike su koje se koriste u procesu kapsuliranja, pri čemu nastaju mikrokapsule (1 do 1000 μm), submikronske kapsule (nekoliko stotina nanometara do manje od 1 μm), i nano-kapsule (1 do nekoliko stotina nanometara). Nano-kapsule pružaju veću površinu koja povećava topljivost u usporedbi s mikrokapsulama (Rodríguez i sur., 2016; Lević i sur., 2015; O'Toole i sur., 2012). Nano-kapsule imaju bolji doprinos bioraspoloživosti i produženom oslobađanju lijeka, što omogućuje precizno ciljanje bioaktivnih spojeva (de Souza Simões i sur., 2017; Yang i sur., 2017; Yao, i sur., 2016).

2.3.1. Nosači koji se koriste u mikro- i nano-inkapsulaciji

Odabir prikladnog sredstva za kapsuliranje jedan je od glavnih čimbenika uspješnosti procesa inkapsulacije bioaktivnih spojeva. U ovom procesu može se koristiti mnogo materijala. Sa stajališta zdravlja i sigurnosti, sredstva za kapsuliranje moraju imati GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) status, odnosno biti odobrena kao „općenito priznata kao sigurna” za primjenu u hrani (Robin & Sankhla, 2013). U aspektu funkcionalnosti, sredstva za kapsuliranje prvo bi trebala biti dobar emulgator, niske viskoznosti pri visokoj koncentraciji i posjedovati dobre karakteristike rastvaranja i formiranja mreže. Trebala bi imati sposobnost da očuvaju bioaktivne spojeve pri različitim uvjetima obrade i skladištenja, bez sklonosti da izazivaju ili pomažu u kemijskim interakcijama s bioaktivnim spojevima. Sredstva koja se najčešće koriste za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva građena su od polisaharida, proteina ili lipida (Jain i sur., 2016; Fathi i sur., 2012).

β-ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi dobiveni enzimatskom modifikacijom škroba. Imaju molekule oblika krnjeg stošca, s hidrofobnom šupljinom iznutra i hidrofilnom vanjskom površinom. Stoga omogućuju stvaranje molekularne inkluzije kompleksa s molekulama koje su slabo topljive u vodi (npr. polifenoli) i povećavaju molekularnu topljivost. U prirodi su najčešći ciklodekstrini sastavljeni od 6, 7 i 8 glukopiranoznih jedinica i nazivaju se α-, β-, odnosno γ-ciklodekstrin. β-ciklodekstrin se opsežno primjenjuje u svrhu kapsulacije zbog niske cijene (Duchêne i Bochot, 2016). Astray i sur. (2009) izvijestili su o ciklodekstrinima kao aditivima u hrani s različitim namjenama: zaštita lipofilnih komponenti hrane od oksidativne i toplinske degradacije, otapanje prehrambenih boja i vitamina, stabilizacija mirisa, okusa, vitamina i eteričnih ulja, inkapsulaciju neugodnih mirisa ili okusa, dobivanje kontroliranog oslobađanja određenih bioaktivnih spojeva.

Maltodekstrini

Dekstrini su hidrolizirani škrobovi topljivi u vodi koji uključuju različite modificirane škrobove s varijacijom vrijednosti ekvivalenta dekstroze (DE). Dekstrini s vrijednostima DE ispod 20 označavaju se kao maltodekstrini, dok se oni DE veći od 20 nazivaju glukoza sirupi, krute tvari glukoze ili krute tvari kukuruznog sirupa. Maltodekstrini su dekstrini s DE vrijednošću < 20, visoko su topljivi u vodi (~70 %) i niske viskoznosti u otopini, značajni u smanjenju poteškoća s lijepljenjem i aglomeracijom (Shishir, i sur., 2016; Alvani i sur., 2011). Naširoko se koriste u preradi hrane i lijekova zbog svojih višenamjenskih doprinosa u povećanju volumena i oblaganja, vezivanju okusa i masti, smanjenju propusnosti stijenke nosača za kisik. Oni doprinose zaštiti hranjivih tvari, boja, antioksidansa i bioaktivnih spojeva od oksidativnog gubitka i toplinske razgradnje tijekom sušenja i skladištenja (Shishir i sur., 2016). Općenito, maltodekstrini s višom vrijednošću DE imaju nižu molekularnu težinu i veću topljivost, ali viša vrijednost DE uzrokuje veći sadržaj vlage u konačnom proizvodu, zbog toga što ima više hidrofilnih skupina (Tonon i sur., 2009). Trenutno se maltodekstrin miješa s gumama, pektinima, alginatom i proteinom sirutke za kapsuliranje bioaktivnih spojeva kako bi se poboljšala svojstva emulgiranja, smanjila propusnost stijenke nosača za kisik, poboljšalo zadržavanje bioaktivnih tvari i kontrolirao profil otpuštanja (Assadpour i sur., 2017; Busch i sur., 2017; Dag, i sur., 2017).

Arapska guma

Gume i njihovi derivati imaju široku primjenu u hrani i farmaciji zahvaljujući njihovoj jedinstvenoj funkcionalnosti, netoksičnosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i sigurnosti za ljudsku potrošnju. Gume na biljnoj bazi općenito se klasificiraju u četiri kategorije prema njihovom podrijetlu: gume sjemena (npr. guar guma), gume izlučevina biljaka (npr. arapska guma), gume izlučevina mikroorganizama (npr. ksantanska guma) i gume morske trave (npr. karagenani) (Prajapati i sur., 2013). Gume imaju izvrsnu sposobnost kapsuliranja okusa, aroma, fenolnih spojeva, antioksidansa i nutraceutskih spojeva (Busch i sur., 2017; Dag i sur., 2017). Gume se općenito koriste u kombinaciji s drugim sredstvima za kapsuliranje (npr. modificirani škrobovi, kitozan). Arapska guma ima dobru sposobnost topljenja i stvaranja stabilnih emulzija, a posjeduje i sposobnost stvaranja filmova (Mariod, 2018). Prilikom inkapsulacijskog procesa sušenja raspršivanjem, arapska guma sprječava operativne probleme i minimizira strukturne promjene poput kristalizacije tijekom skladištenja (Mohsin i sur., 2022; Mohd Roby i sur., 2020).

2.3.2. Sušenje raspršivanjem

Za inkapsuliranje fenolnih spojeva koriste se različite tehnike ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama, uključujući sušenje raspršivanjem, ekstruziju, koacervaciju molekularne inkluzije, umrežene micelle, emulziju, mikrogelove, liposome i elektrosprej između ostalog (Nogueira i sur., 2020; Rahalee i sur., 2020).

Sušenje raspršivanjem jedna je od najkorištenijih tehnika za mikrokapsulaciju bioaktivnih spojeva. To je jednostavan, brz i relativno jeftin proces. Osnovni principi sušenja raspršivanjem su raspršivanje tekućeg punjenja u komoru za sušenje u obliku sitnih kapljica koje sadrže bioaktivne spojeve, dovod vrućeg zraka u komoru za sušenje, formiranje mikrokapsula u komori za sušenje i odvajanje mikrokapsula kroz oporavak ciklona (Shishir i Chen, 2017; Ray i sur., 2016; Nesterenko i sur., 2013).

Općenito se kao medij za sušenje koristi zagrijani zrak, osim u slučajevima kada smjesa za sušenje sadrži lako zapaljiva otapala poput etanola ili metilen klorida, kada se kao medij za sušenje koristi dušik (Mujumdar, 2007). Princip sušenja raspršivanjem jednak je neovisno o tipu uređaja i proizvođaču. Tekućina se raspršuje u kapljice na vrhu komore za sušenje. Kapi putuju u turbulentni tok zagrijanog zraka na vrhu komore u istom smjeru kao i zagrijani zrak, što je poznato kao istostrujno strujanje. Tekuća faza se brzo zagrijava i molekule tekućine kreću se

prema površini kapi i prelaze u plinovitu fazu. Dok se kapi skrućuju, one su zahvaćene protokom zagrijanog plina i kreću se u komoru ciklonskog protoka gdje se krute tvari miču iz komore i plin se ispušta u atmosferu.

Svi uređaji za sušenje raspršivanjem koriste osnovne komponente iako postoje varijante u konfiguraciji komore, korištenim raspršivačima, ciklonskom dizajnu, recikliranju krutih tvari, kondicioniranju ili recirkulaciji plina nakon kondenzacije i/ili hlađenja, dizajnu protoka zraka i priključenim uređajima kao što su npr. čistači zraka ili uređaji za naknadno filtriranje ili pranje. Uređaji za sušenje raspršivanjem dolaze u veličinama isparavanja od manje od litre na sat do tisuća litara na sat (Jacobs, 2014).

2.4. STABILNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Na stabilnost bioaktivnih spojeva (BAS) prisutnih u začinskom i aromatskom bilju, voću, povrću i njihovim prerađevinama, utječu brojni faktori kao što su: temperatura, svjetlo, pH, kisik, prisutnost šećera, enzima, iona metala. Faktori koji također mogu utjecati na stabilnost BAS su i postupci i vrsta prerade, vrsta ambalaže i uvjeti skladištenja. Zbog svoje kemijske strukture mnogi fenolni spojevi dobri su supstrati i sudjeluju u nepoželjnim reakcijama enzimskog posmeđivanja, a pri višim temperaturama i u reakcijama neenzimskog posmeđivanja. Industriji je u cilju i interesu spriječiti ovakve reakcije te na taj način povećati prehrambenu, organoleptičku i senzorsku kvalitetu proizvoda, a za to je potrebno razumijevanje mehanizama razgradnje fenolnih spojeva (Zorić, 2014).

2.4.1. Utjecaj inkapsulacije na stabilnost bioaktivnih spojeva

Inkapsulacija može smanjiti razgradnju fenolnih spojeva tijekom obrade ili skladištenja te nakon fiziološke razgradnje probavom u ljudskom organizmu. Većina fenolnih spojeva pokazuje povećanje stabilnosti, bioraspoloživosti, ili biološke aktivnosti nakon njihove inkapsulacije. Ovakav pozitivan učinak rezultat je povećanja drugih karakteristika i fizikalno-kemijskih svojstava, koji uključuju topljivost u vodi te kemijsku stabilnost (Nishimoto-Sauceda, 2021).

Na stabilnost fenolnih spojeva utječe i vrsta nosača korištena tijekom procesa inkapsulacije. Zhang i sur. (2019) su u svom istraživanju koristili razne nosače i njihove kombinacije za inkapsulaciju soka brusnice sušenjem raspršivanjem. Iz rezultata istraživanja zaključeno je da DE vrijednost maltodekstrina nema značajnijeg utjecaja na stabilnost

inkapsuliranih fenolnih spojeva. Kada je kao nosač korištena arapska guma, sadržaj ukupnih fenola tijekom sušenja raspršivanjem bio je veći nego kad se za nosač koristio maltodekstrin što ukazuje na bolju zaštitu fenolnih spojeva. Pokazalo se da je još veći sadržaj ukupnih fenola određen kad je za nosač korištena kombinacija maltodekstrina i arapske gume, nego kad su zasebno korištena oba nosača, što potvrđuje i istraživanje Idhama i sur. (2012). Kombinacija nosača daje povoljne uvjete za inkapsulaciju kombiniranjem prednosti oba materijala. Maltodekstrini stupaju u interakciju s fenolima te s njima stvaraju kompleks i tako ih stabiliziraju. Arapska guma u svom sastavu sadrži 2 % proteina koji je kovalentno vezan na ugljikohidratni lanac i dobro poznat po tome što ima sposobnost stvaranja filma i na taj način stabilizira inkapsulirane fenolne spojeve (Zhang i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci lovora

U ovom istraživanju korišteni su osušeni uzorci lišća lovora (*Laurus nobilis* L.), prikupljeni u studenom 2021. u Riječkoj regiji u Hrvatskoj, a kupljeni od tvrtke Šafram d.o.o. (Zagreb, Hrvatska). Osušeno lišće čuvano je pri sobnoj temperaturi.

3.1.2. Kemikalije

- Etanol, 50 %-tni i 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- β -ciklodekstrin (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Maltodekstrin (DE 4-7, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Arapska guma (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Destilirana voda
- Metanol, 100 %-tni i 80 %-tni (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)
- Dušik (Messer, Zaprešić, Hrvatska)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Acros Organics, SAD)
- 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Acros Organics, Belgija)
Priprema: 0,02 g DPPH radikala odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te se preko staklenog lijevka kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u 100 %-tnom metanolu nakon čega se tikvica nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. DPPH je potrebno čuvati u zatvorenoj tikvici na tamnome.
- Kalijev persulfat (Acros Organics, SAD)
- ABTS reagens (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) (Acros Organics, SAD)
- Mravlja kiselina (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Acetonitril HPLC čistoće (J.T. Baker Chemicals, Deventer, Netherlands)
- Metanol HPLC čistoće (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ, Milipore, SAD

3.1.3. Aparatura

- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska)
- Mikrovalni reaktor (Ethos Easy, Milestone, Italija)
- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Magnetska miješalica (HSC Ceramic Hot Top-Plate Stirrer, Velp, Italija)
- Uređaj za sušenje raspršivanjem (Büchi, Mini Spray Dryer B-290, Flawil Švicarska)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic S 40H, Elma, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Laboratorijski sušionik (Nüve FN 500, Turska)
- Eksikator (LLG-Labware, Meckenheim, Njemačka)
- Uređaj za pročišćavanje destilirane vode (MilliQ, Milipore, SAD)
- Tekućinski kromatograf (HPLC –Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, CA, SAD)
opremljen sa:
 - Kvarternom pumpom, model 1260
 - Autosamplerom, model 1260
 - Termostatom, model 1260
 - PDA/DAD detektorom, model 1260
 - Fluorescentnim detektorom, model 1260
 - Detektorom indeksa refrakcije, model 1260

3.1.4. Pribor

- Staklene čaše
- Stakleni štapići
- Magneti za miješanje
- Plastične žlice
- Metalna špatula
- Boce od tamnog stakla volumena 1 L
- Aluminijske posudice

- Staklenke
- Parafilm
- Plastične ladice za vaganje
- Falcon epruvete volumena 25 mL
- Menzure volumena 500 mL, 1 L
- Odmjerne tikvice volumena 5, 10, 25, 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Automatske mikropipete volumena 1-10, 10-100, 100-1000 i 100-5000 μ L
- Staklene vijale
- Staklene epruvete
- Aluminijska folija
- Medicinska šprica i igla
- 0,45 μ m filter Chromafil Xtra Pet (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. MAE polifenola iz lišća lovora

Masa od 8 g uzorka odvagana je u ćeliju ekstraktora i homogenizirana s 50 mL 50 %-tnog etanola. U ćeliju se pritom dodao magnetni mješač te se ćelija postavila na rotor mikrovalnog ekstraktora. Ekstrakcijski uvjeti predočeni su u tablici 2 i određeni su prema prethodno provedenom istraživanju (Dobrosravić i sur., 2021).

Tablica 2. Optimalni uvjeti MAE polifenola iz lišća lovora (*prema* Dobrosravić i sur., 2021)

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| Ekstrakcijsko otapalo | 50 %-tni etanol |
| Vrijeme ekstrakcije | 10 min |
| Temperatura ekstrakcije | 80 °C |
| Snaga mikrovalova | 400 W |

Nakon završenog postupka ekstrakcije, uzorci su profiltrirani kroz filter papir u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjeni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Postupak se ponavlja dok

se ne dobije ukupan volumen ekstrakta 1 L koji se prenese u čistu praznu bocu od tamnog stakla, propuše dušikom i čuva pri -18 °C do provođenja nastavka eksperimenta.

3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko 2 h sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću ±0,0002 g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 2 mL ekstrakta (kod određivanja ukupne suhe tvari ekstrakta) i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od ±0,0002 g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik, prethodno zagrijan na 105 ± 0,5 °C te se zagrijava 1 h sa zaklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od 30 min, ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću ± 0,0002 g.

Izračun:

Ukupna suha tvar izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{ukupna suha tvar}(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_0 – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g),

m_1 – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g),

m_2 – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

Sadržaj ukupne suhe tvari usitnjenog lišća lovora prije MAE bio je veći od 95 %, dok je u ekstraktu dobivenom primjenom MAE sadržaj ukupne suhe tvari bio 4,7 %.

3.2.3. Proizvodnja praha ekstrakta lišća lovora primjenom sušenja raspršivanjem

Za ovo istraživanje proizvedena su 3 praha ekstrakta lišća lovora pomoću uređaja za sušenje raspršivanjem (slika 5). Plan pokusa prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Plan pokusa proizvodnje praha ekstrakta lišća lovora primjenom sušenja raspršivanjem

| Broj praha | Oznaka praha | Omjer nosača | Omjer suhe tvari ekstrakta i nosača | Temperatura (°C) |
|------------|----------------|--------------|-------------------------------------|------------------|
| 1 | β -CD | | 1:2 | 180 |
| 2 | β -CD:MD | 50:50 | 1:2 | 180 |
| 3 | β -CD:GA | 50:50 | 1:2 | 180 |

β -CD= β -ciklodekstrin, MD=maltodekstrin, GA=arapska guma

Za proizvodnju prahova korišteni su nosači β -ciklodekstrin (β -CD) te kombinacije β -CD i maltodekstrina (MD), odnosno β -CD i arapske gume (GA) (tablica 3). Potrebna masa nosača određena je na temelju suhe tvari ekstrakta lišća lovora (4,7 %). Na analitičkoj vagi u laboratorijsku čašu od 500 mL odvažuje se 18,8 g nosača te se doda 200 mL destilirane vode. Kako bi se nosač potpuno otopio, u otopinu se stave 2 magneta te se otopina stavi na magnetsku miješalicu na konstantno miješanje 30 min uz brzinu okretaja 300 o/min. Zatim se u otopinu doda 200 mL ekstrakta, miješanje se nastavi te se magnetska miješalica zajedno s otopinom postavi na uređaj za raspršivanje i započne se sušenje. Nakon provedenog procesa sušenja, proizvedeni prahovi uskladište se u hermetički zatvorene staklenke koje se oblože aluminijskom folijom te se čuvaju pri sobnoj temperaturi do provođenja daljnjih analiza.



Slika 5. Uređaj za sušenje raspršivanjem (vlastita fotografija)

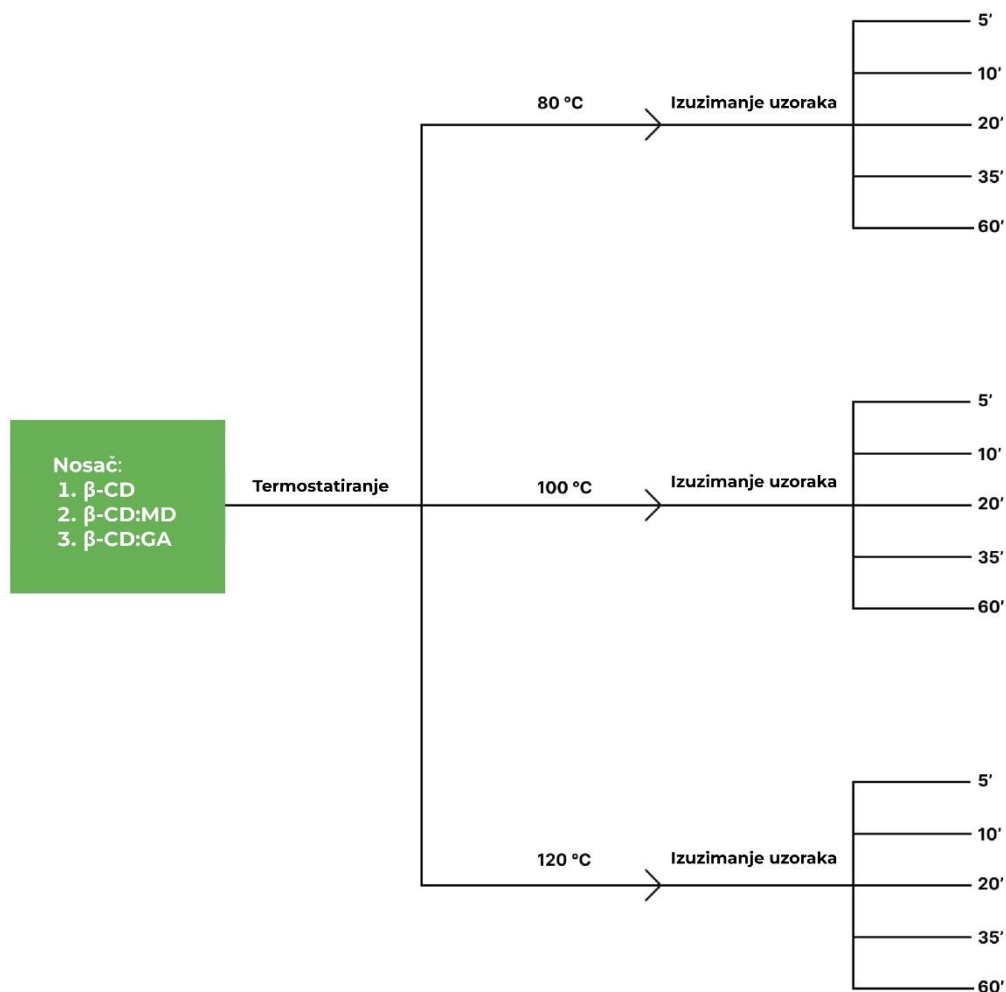
Parametri koji su tijekom procesa sušenja raspršivanjem bili konstantni prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti sušenja raspršivanjem – konstantni parametri tijekom procesa

| | |
|---|-----------|
| Temperatura zraka na ulazu | 180 °C |
| Temperatura zraka na izlazu | 77 °C |
| Protok ulaznog materijala | 473 mL/h |
| Kapacitet aspiratora | 80 % |
| Stupanj čišćenja mlaznice | 4 |
| Miješanje na magnetskoj miješalici | 300 o/min |

3.2.4. Tretiranje prahova pri povišenim temperaturama

U 5 staklenih epruveta odvaže se po 0,5 g uzorka od svakog praha (β -CD, β -CD:MD i β -CD:GA) te stave u laboratorijski sušionik pri konstantnoj temperaturi (80, 100 i 120 °C). Termostatirani uzorci su se izuzimali nakon 5, 10, 20, 35 i 60 min kako je prikazano u planu eksperimenta (slika 6), kratko ohladili pod mlazom hladne vode, propuhali dušikom, začepili te čuvali pri -60 °C do provođenja daljnjih analiza.



Slika 6. Shema toplinskog tretmana prahova

3.2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Na analitičkoj vagi odvažuje se po 0,5 g svakog od početna 3 praha u Falcon epruvete, dok su toplinski tretirani prahovi već u staklenim epruvetama u količini od 0,5 g. U sve epruvete i Falcon epruvete doda se po 5 mL 80 %-tnog metanola te se sadržaj unutar epruveta promiješa na vortexu. Falcon epruvete se začepuju plastičnim čepom, dok se staklene epruvete začepuju aluminijском folijom. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija provodi se 15 min pri 50 °C u ultrazvučnoj kupelji (slika 7). Nakon završene ekstrakcije, sadržaj epruveta i Falcon epruveta

profiltrira se u odmjerne tikvice od 5 mL preko staklenih lijevaka s nabranim filter papirima. Zaostali talog praha u epruvetama i Falcon epruvetama ispere se s još 0,5 mL 80 %-tnog metanola. Odmjerne tikvice pažljivo se nadopune 80 %-tnim metanolom do oznake i promiješaju. Dobiveni ekstrakti profiltriraju se kroz 0,45 µm filtar (Machery-Nagel, Njemačka) u HPLC viala, propušu dušikom i čuvaju pri -18 °C do provođenja daljnjih analiza.



Slika 7. Ultrazvučna kupelj (vlastita fotografija)

3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/Vis PDA detekciju

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/Vis PDA temelji se na gradijentnoj eluaciji, pri čemu se ekstrahirani polifenoli eluiraju u nizu padajuće polarosti (Zorić, 2014).

HPLC analiza provedena je na HPLC –Agilent 1260 Infinity tekućinskom kromatografu koji je opremljen PDA/DAD detektorom, kvarternom pumpom, autosamplerom i termostatom. Određivanje fenolnih spojeva provedeno je prema metodi koju su prethodno opisali Zorić i sur. (2014). Otapala koja se koriste kao mobilna faza odzračuje se 5 min u ultrazvučnoj kupelji. Kromatografski uvjeti prikazani su u tablici 5, dok je gradijent prikazan u tablici 6.

Tablica 5. Kromatografski uvjeti za HPLC UV/Vis PDA analizu fenolnih spojeva (*prema Zorić i sur., 2014*)

| | |
|--------------------------------------|--|
| Kolona | Nucleosil 100-5C18, 5 μ m (250 \times 4,6 mm I.D.) |
| Pokretna faza | otapalo A: 3 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 3 % mravlja kiselina u 80%-tnoj vodenoj otopini acetonitrila |
| Detektor | UV/Vis PDA |
| Eluiranje | gradijentno |
| Temperatura | 22 $^{\circ}$ C |
| Vrijeme trajanja | 55 min |
| Injektirani volumen | 10 μ L |
| Vrijeme uravnoteženja kolone: | 2 min |

Tablica 6. Gradijent eluacije za HPLC UV/Vis PDA analizu fenolnih spojeva (*prema Zorić i sur., 2014*)

| t (min) | Otapalo A | Otapalo B | Protok (mL/min) |
|----------------|------------------|------------------|------------------------|
| 0 | 100 | 0 | 0,8 |
| 28 | 75 | 25 | 0,8 |
| 35 | 50 | 50 | 0,8 |
| 40 | 20 | 80 | 0,8 |
| 45 | 100 | 0 | 0,8 |
| 55 | 100 | 0 | 0,8 |

3.2.6.1. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva

Identifikacija fenolnih spojeva provodi se analizom dobivenih kromatograma, karakterističnih UV/Vis apsorpcijskih spektara i retencijskih vremena te usporedbom sa standardima. Za spojeve kojima nedostaju referentni standardi, identifikacija se temelji na literaturnim podacima o njihovim retencijskim vremenima. Pošto polifenoli apsorbiraju u UV dijelu spektra, detekcija se vrši na valnim duljinama 278 i 340 nm. Kvantitativne vrijednosti za fenolne spojeve izračunaju se iz jednažbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju

ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja (tablica 7). Dobivene masene koncentracije (mg/L) spojeva preračunaju se na masu suhe tvari uzorka (mg/100 g s.tv.).

Tablica 7. Jednadžbe baždarnih pravaca za standarde korištene u HPLC analizi

| Standard | Jednadžba pravca |
|--|------------------|
| Epigalokatehin galat | $y = 9,5339 x$ |
| Epikatehin galat | $y = 12,693 x$ |
| Katehin | $y = 12,037 x$ |
| Epikatehin | $y = 10,929 x$ |
| Galna kiselina | $y = 30,025 x$ |
| Procijanidin B1 | $y = 3,57 x$ |
| Procijanidin B2 | $y = 7,8852 x$ |
| <i>p</i> -kumarinska kiselina | $y = 135,81 x$ |
| Kafeinska kiselina | $y = 68,301 x$ |
| Kvercetin-3-glukozid (kvercetin-3-rutinozid) | $y = 37,386 x$ |
| Kamferol-3-rutinozid (kamferol-3-glukozid) | $y = 41,313 x$ |
| Luteolin | $y = 119,39 x$ |
| Apigenin | $y = 107,04 x$ |

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) stabilan je dušikov radikal, tamno-ljubičastog obojenja. Zbog nesporenog elektrona, princip određivanja temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala, pri čemu dolazi do sparivanja nesporenog elektrona. Reakcija se očituje promjenom boje iz ljubičaste u žutu, što se spektrofotometrijski prati kao pad apsorbancije pri 517 nm. Prednosti ove metode očituju se u jednostavnosti izvedbe pa se često koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak određivanja:

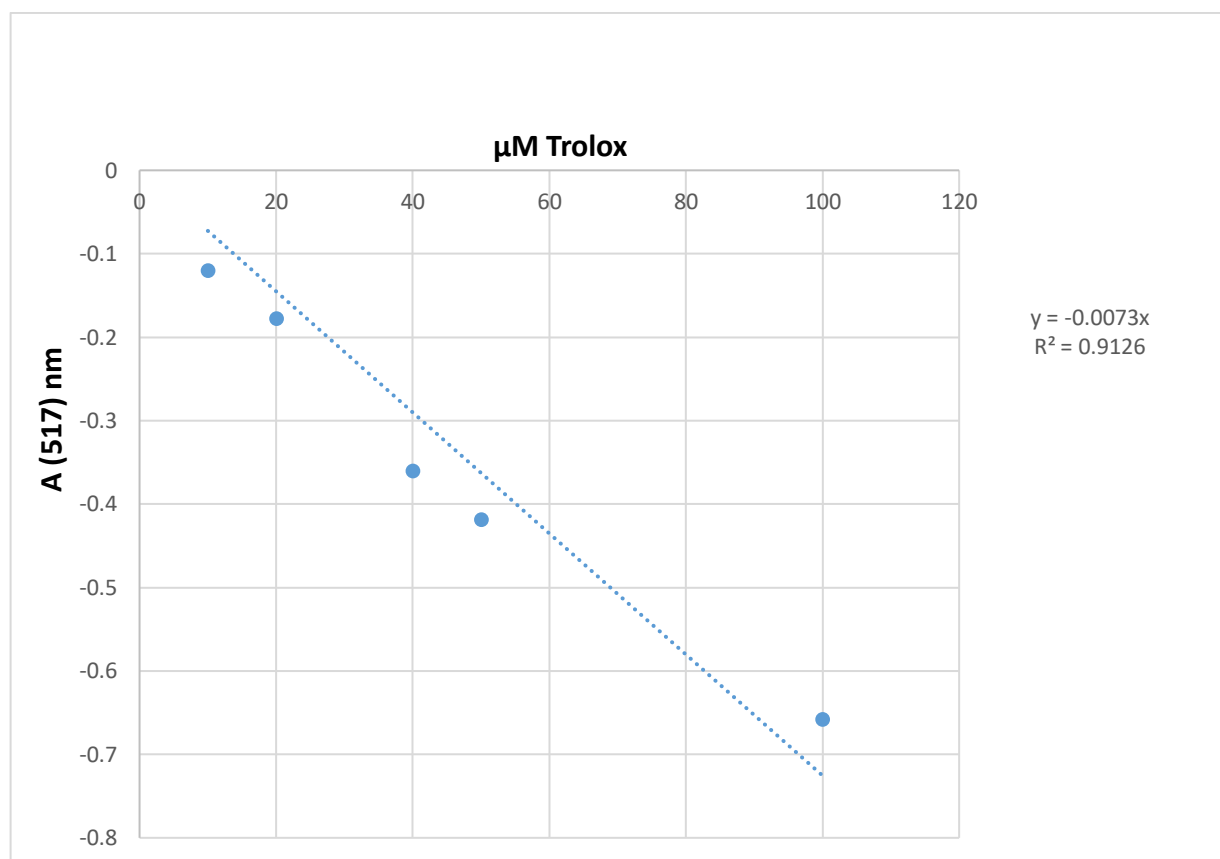
Prije početka određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je pripremiti 0,5 mM otopinu DPPH na način da se 0,02 g DPPH otopi u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL, a zatim nadopuni metanolom do oznake.

U staklenu epruvetu otpipetira se 1 mL ekstrakta, 1 mL metanola, 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH te se ostave stajati 20 min pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 20 min mjeri se

apsorbancija pri 517 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, no osim 1 mL ekstrakta, dodaje se 1 mL metanola. Za ovu analizu ekstrakti se razrijede 250x.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Odvaga od 500 mg Troloxa odvažuje se u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake metanolom. Od ove otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 20, 40, 50, 100 μM . Postupak određivanja je jednak, samo što se umjesto ekstrakta, u epruvete stavlja Trolox. Na temelju izmjerenih apsorbancija pri 517 nm dobije se jednadžba pravca (slika 8).



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,0073x \quad R^2 = 0,9797 \quad [2]$$

gdje je:

y = apsorbancija uzorka pri 517 nm

x = ekvivalent Troloxa (μM)

R^2 = koeficijent determinacije.

Rezultati su izraženi u μmol Trolox ekvivalenta (TE)/g praha.

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

ABTS metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a 12 sati prije analize. Udio ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa, analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Prior, 2005).

Priprema reagensa:

1.dan

- 1) 140 mM otopina kalijeva persulfata, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0,1892 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ izvaže se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi),
- 2) 7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake),
- 3) stabilna $\text{ABTS}^{\cdot+}$ otopina; pripremi se tako da se 88 μL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ otopine prenese u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 sati, zamotano u Al-foliju. Konačna koncentracija $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ pri tome je 2,45 mM.

2.dan

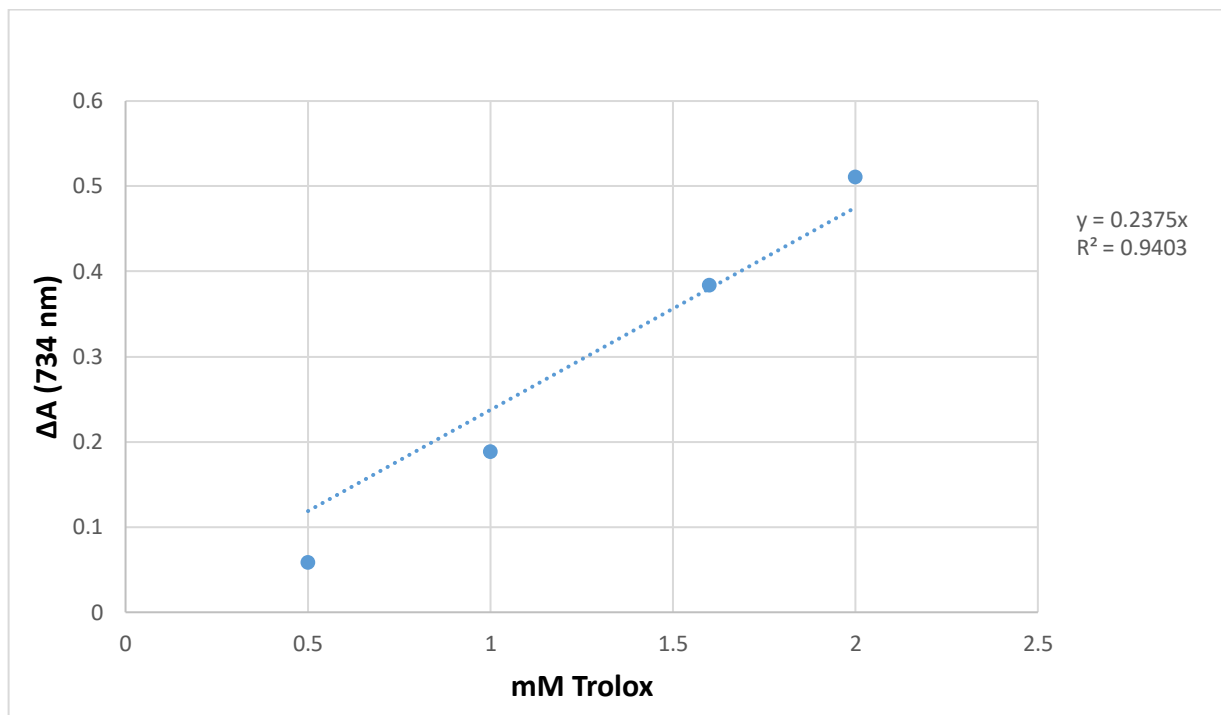
Na dan provođenja analiza, pripremi se 1 %-tna otopina $\text{ABTS}^{\cdot+}$; 500 μL $\text{ABTS}^{\cdot+}$ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake. Podešava se koncentracija $\text{ABTS}^{\cdot+}$ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$. Podešavanje koncentracije se vrši na način da ako je apsorbancija veća od navedene vrijednosti, u otopinu se dodaje kap po kap 96 %-tnog etanola, a ako je apsorbancija niža od navedene vrijednosti, u otopinu se dodaje kap po kap $\text{ABTS}^{\cdot+}$ otopine sve dok se ne postigne željena apsorbancija. Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

Za ovu analizu ekstrakti se razrijede 50x. U staklenoj epruveti, alikvot od 20 μL razrijeđenih uzoraka ekstrakta pomiješa se s 2 mL otopine $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala te se izmjeri apsorbancija pri

valnoj duljini 734 nm nakon točno 1 min. Slijepa proba pripremi se na isti način kao i reakcijska smjesa, samo što umjesto uzorka sadrži 20 μL 96 %-tnog etanola. Bitno je napomenuti da prilikom rada na spektrofotometru, „blank“ u ovom slučaju nije slijepa proba, već 96 %-tni etanol. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema baždarnom pravcu za Trolox preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa) (Re i sur., 1999). Rezultati se izražavaju kao molarni (mmol/g suhe tvari) udjel ekvivalenata Troloxa.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti polaznu otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 M. U plastičnoj lađici za vaganje odvaži se 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake metanolom. Iz tako pripremljene otopine naprave se razrjeđenja koja odgovaraju koncentracijama otopine Troloxa od 0,5; 1, 1,33; 1,6 i 2 mM. Reakcijska smjesa umjesto ekstrakta sadrži 20 μL otopine Troloxa poznatih koncentracija. Slijepa proba pripremi se na isti način kao i reakcijska smjesa, samo što umjesto otopine Troloxa sadrži 20 μL 96 %-tnog etanola. Bitno je napomenuti da prilikom rada na spektrofotometru, „blank“ u ovom slučaju nije slijepa proba, već 96 %-tni etanol. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Promjena apsorbancije (ΔA) računa se oduzimanjem apsorbancije uzoraka sa Troloxom od apsorbancije slijepa probe. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanese koncentracije Troloxa (mM), a na ordinati izračunate vrijednosti ΔA (slika 9).



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti promjene apsorbancije pri 734 nm o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadža pravca glasi:

$$y = 0,2375x \quad R^2 = 0,9977 \quad [3]$$

gdje je:

y = razlika apsorbancije slijepe probe i apsorbancije uzorka pri 734 nm

x = ekvivalent Troloxa (mM)

R^2 = koeficijent determinacije.

Rezultati su izraženi u mmol TE/100 g praha.

3.2.9. Obrada podataka

Istraživanja su pokazala da toplinska razgradnja fenolnih spojeva slijedi kinetiku reakcije prvog reda (Zapata i sur. 2022; Carvalho Laga i Zapata Norena 2017; Patras i sur. 2010; Verbeyst i sur. 2010).

Ovaj tip reakcija općenito se može izraziti pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\omega(t) = \omega_0 \cdot \exp(-k \cdot t) \quad [4]$$

u kojoj je:

$\omega(t)$ = maseni udio spoja u vremenu t ,

ω_0 = početni maseni udio (mg/100 g s.tv.),

t = vrijeme tretiranja (min),

k = konstanta degradacije za reakcije prvog reda.

Uz pretpostavku da degradacija fenolnih spojeva slijedi kinetiku prvog reda, vrijeme poluraspada može se izraziti sljedećom jednačinom:

$$t_{1/2} = -\ln 0.5/k \quad [5]$$

gdje je:

$t_{1/2}$ = vrijeme poluraspada (min)

k = konstanta degradacije za reakcije prvog reda.

Utjecaj temperature na konstantu brzine degradacije fenolnih spojeva može se izraziti Arrheniusovom jednačinom:

$$k(T) = k_0 \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R \cdot T}\right] \quad [6]$$

u kojoj je:

k – konstanta brzine kemijske degradacije

k_0 – konstanta maksimalne brzine degradacije

E_a – energija aktivacije (kJ/mol)

R – opća plinska konstanta (8,314 J/Kmol)

T – apsolutna temperatura (K).

3.2.9.1. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka provedena je programom Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Multifaktorska analiza varijance (MANOVA) korištena je kako bi se utvrdila važnost utjecaja pojedinih varijabli (temperatura, vrijeme izlaganja, različiti nosači) na promatrane parametre (kinetički parametri, degradacija fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost). Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a sve srednje vrijednosti rezultata uspoređene su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj temperature, vremena toplinskog tretmana, upotrebe različitih nosača i njihovih kombinacija prilikom inkapsulacije fenolnih spojeva lišća lovora sušenjem raspršivanjem, na degradaciju fenolnih spojeva i pripadajuće kinetičke parametre te antioksidacijsku aktivnost.

Sva mjerenja rađena su u duplikatu pa su rezultati prilikom statističke analize obrađeni kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je HPLC UV/Vis PDA analizom te su identificirani i kvantificirani fenolni spojevi podijeljeni u 4 grupe: pro(anto)cijanidini, flavan-3-oli, fenolne kiseline i flavanol-glikozidi. Rezultati su prikazani tablično.

Kinetika degradacije promatrana je na razini navedene 4 skupine fenolnih spojeva. Kinetički parametri računati su na temelju jednadžbi opisanih u poglavlju 3.2.9. Rezultati kinetičke analize prikazani su dijelom grafički, a dijelom tablično.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH i ABTS metodom provedeno je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije uzoraka, a rezultati su prikazani grafički.

4.1. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA LOVORA

Identificirani i kvantificirani fenolni spojevi u početnim prahovima ekstrakta lovora određeni HPLC UV/Vis metodom, prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Maseni udjeli fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora izraženi kao prosječna vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm st.dev. (mg/100 g praha)

| Fenolni spojevi | β -CD | β -CD:MD | β -CD:GA |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Proantocijanidini (mg/100 g praha)</i> | | | |
| Procijanidin | 238,89 \pm 1,78 | 181,36 \pm 1,39 | 150,06 \pm 1,70 |
| Procijanidin dimer | 352,53 \pm 3,18 | 432,68 \pm 2,75 | 359,60 \pm 2,23 |
| Procijanidin trimer | 193,55 \pm 0,77 | 132,63 \pm 1,76 | 147,80 \pm 1,06 |
| Procijanidin tetramer | 888,29 \pm 3,96 | 623,57 \pm 4,33 | 757,24 \pm 2,45 |

β -CD= β -ciklodekstrin, MD=maltodekstrin, GA=arapska guma

Tablica 8. Maseni udjeli fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora izraženi kao prosječna vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm st.dev. (mg/100 g praha) - nastavak

| <i>Flavan-3-oli (mg/100 g praha)</i> | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Katehin | 2,80 \pm 0,04 | 2,24 \pm 0,01 | 2,22 \pm 0,03 |
| Epikatehin galat | 32,93 \pm 0,21 | 28,69 \pm 0,53 | 26,05 \pm 0,53 |
| Derivat katehina | 31,06 \pm 0,40 | 19,16 \pm 0,41 | 15,76 \pm 0,12 |
| <i>Fenolne kiseline (mg/100 g praha)</i> | | | |
| Hidroksibenzojeva kiselina | 6,92 \pm 0,20 | 4,80 \pm 0,04 | 3,00 \pm 0,14 |
| Hidroksicimetna kiselina | 19,81 \pm 0,47 | 7,99 \pm 0,04 | 8,63 \pm 0,13 |
| <i>p</i>-kumarinska kiselina | 1,49 \pm 0,08 | 1,28 \pm 0,01 | 1,44 \pm 0,01 |
| Kafeinska kiselina | 17,66 \pm 0,38 | 14,07 \pm 0,02 | 16,73 \pm 0,30 |
| Derivat <i>p</i>-kumarinske kiseline | 81,26 \pm 0,50 | 69,07 \pm 0,47 | 84,22 \pm 0,69 |
| Derivat kafeinske kiseline | 42,36 \pm 0,13 | 35,09 \pm 0,98 | 48,12 \pm 1,16 |
| <i>Flavonol-glikozidi (mg/100 g praha)</i> | | | |
| Luteolin 6-C-glukozid | 2,89 \pm 0,10 | 2,50 \pm 0,06 | 2,56 \pm 0,12 |
| Apigenin 8-C-glukozid | 1,82 \pm 0,04 | 1,59 \pm 0,06 | 1,56 \pm 0,07 |
| Kvercetin 3-O-rutinozid | 38,98 \pm 0,81 | 33,58 \pm 0,28 | 35,42 \pm 0,66 |
| Apigenin 6-C-glukozid | 14,71 \pm 0,50 | 12,52 \pm 0,10 | 13,35 \pm 0,57 |
| Kvercetin-O-glukozid | 23,24 \pm 0,39 | 20,89 \pm 0,95 | 21,63 \pm 0,58 |
| Kvercetin-O-heksozid | 80,00 \pm 0,80 | 68,19 \pm 0,61 | 70,75 \pm 0,82 |
| Kvercetin-O-pentozid | 68,01 \pm 1,37 | 58,91 \pm 0,91 | 60,96 \pm 0,98 |
| Kamferol 3-O-rutinozid | 44,92 \pm 0,69 | 39,48 \pm 0,03 | 41,45 \pm 0,31 |
| Izoramnetin-O-rutinozid | 156,89 \pm 1,42 | 135,91 \pm 0,4 | 143,02 \pm 2,34 |
| Kamferol-O-pentozid | 154,42 \pm 0,20 | 135,35 \pm 1,57 | 139,35 \pm 0,96 |
| Izoramnetin-O-heksozid | 24,77 \pm 0,16 | 21,27 \pm 0,28 | 22,59 \pm 0,45 |
| Izoramnetin O-pentozid | 2,14 \pm 0,17 | 7,08 \pm 0,03 | 2,05 \pm 0,10 |
| Kamferol-O-heksozid | 8,36 \pm 0,06 | 0,81 \pm 0,05 | 7,55 \pm 0,11 |
| Izoramnetin-O-ramnozid | 77,75 \pm 0,72 | 67,98 \pm 0,15 | 71,12 \pm 0,84 |

Rezultati identifikacije i kvantifikacije fenolnih spojeva pokazali su da je u prahovima ekstrakta lovora prisutno 27 fenolnih spojeva te da najveći maseni udio u svim prahovima imaju

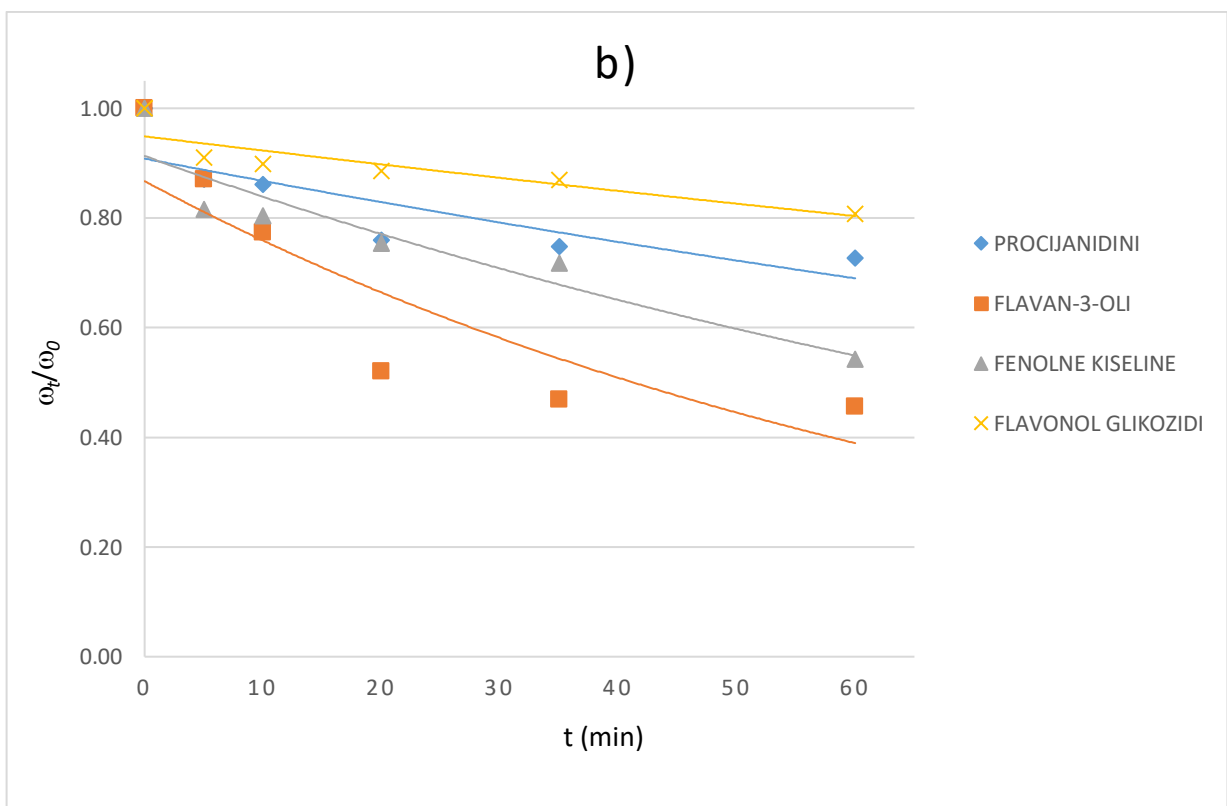
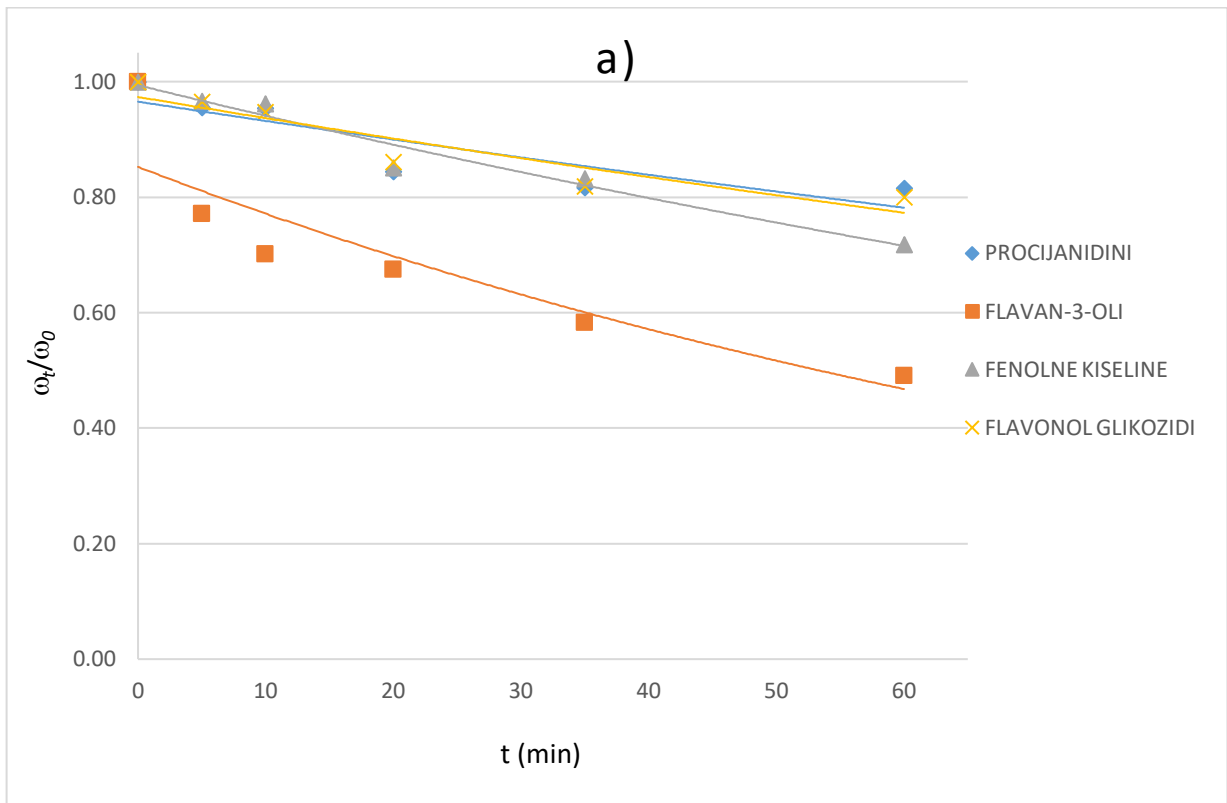
proantocijanidini, a najmanji flavan-3-oli. Maseni udjeli pokazuju da proantocijanidini čine 65-68 % ukupne količine polifenola u listu lovora, flavonol-glikozidi 22-24 %, fenolne kiseline 8-9 %, a flavan-3-oli 2-3 %. Ovakvi rezultati djelomično su u skladu s istraživanjem Dobrosavić i sur. (2023) u kojem je u prahovima ekstrakta lovora identificirano 29 fenolnih spojeva UPLC-MS² metodom, a najveći maseni udio imali su flavonoli. Odstupanja od ovog istraživanja mogu biti objašnjena razlikom u korištenoj metodi za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva. UPLC je obično osjetljivija metoda od HPLC-a zbog svoje sposobnosti postizanja boljeg odvajanja komponenti u uzorku. Ovo poboljšano odvajanje može rezultirati većom osjetljivošću u otkrivanju razina analita u tragovima (Ortega i sur., 2010).

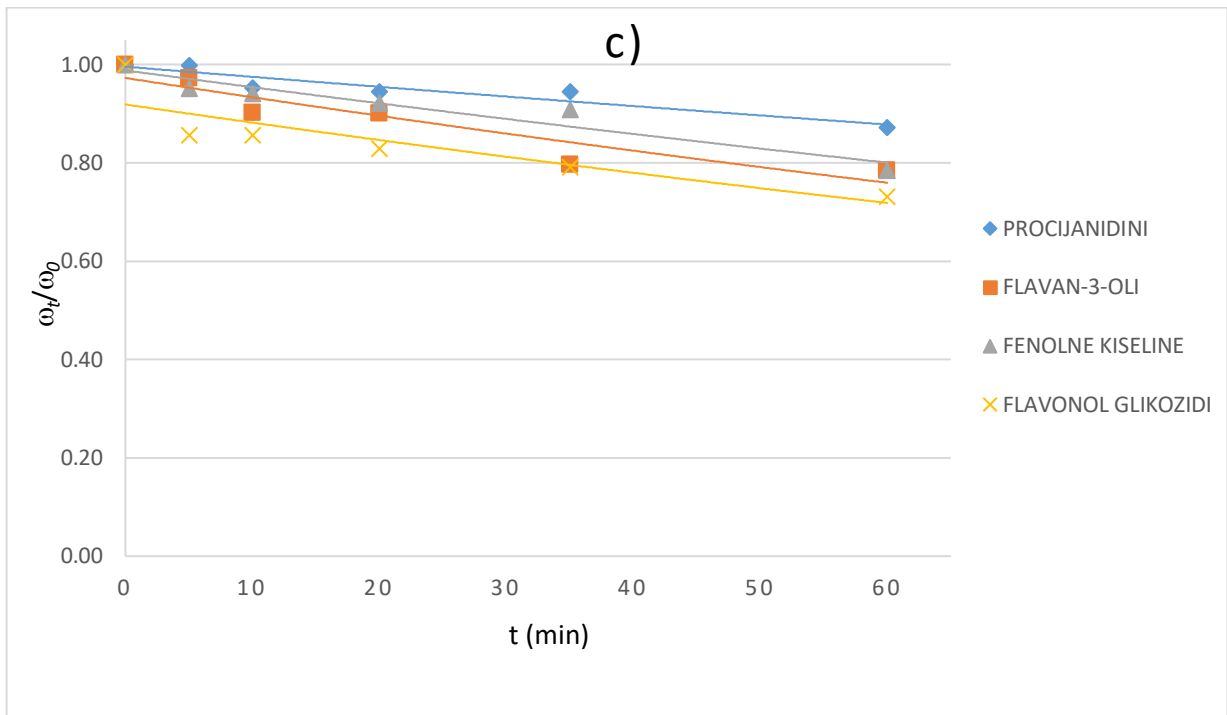
4.2. KINETIČKI PARAMETRI TOPLINSKE DEGRADACIJE FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA LOVORA

Kinetički parametri degradacije procijanidina, flavan-3-ola, fenolnih kiselina i flavonol glikozida prikazani su kao odnos relativnih masenih udjela navedenih grupa fenolnih spojeva (ω_t/ω_0) tijekom vremenski različitog (5-60 min) toplinskog tretmana prahova ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima, pri temperaturama od 80 °C (slika 10), 100 °C (slika 11) i 120 °C (slika 12).

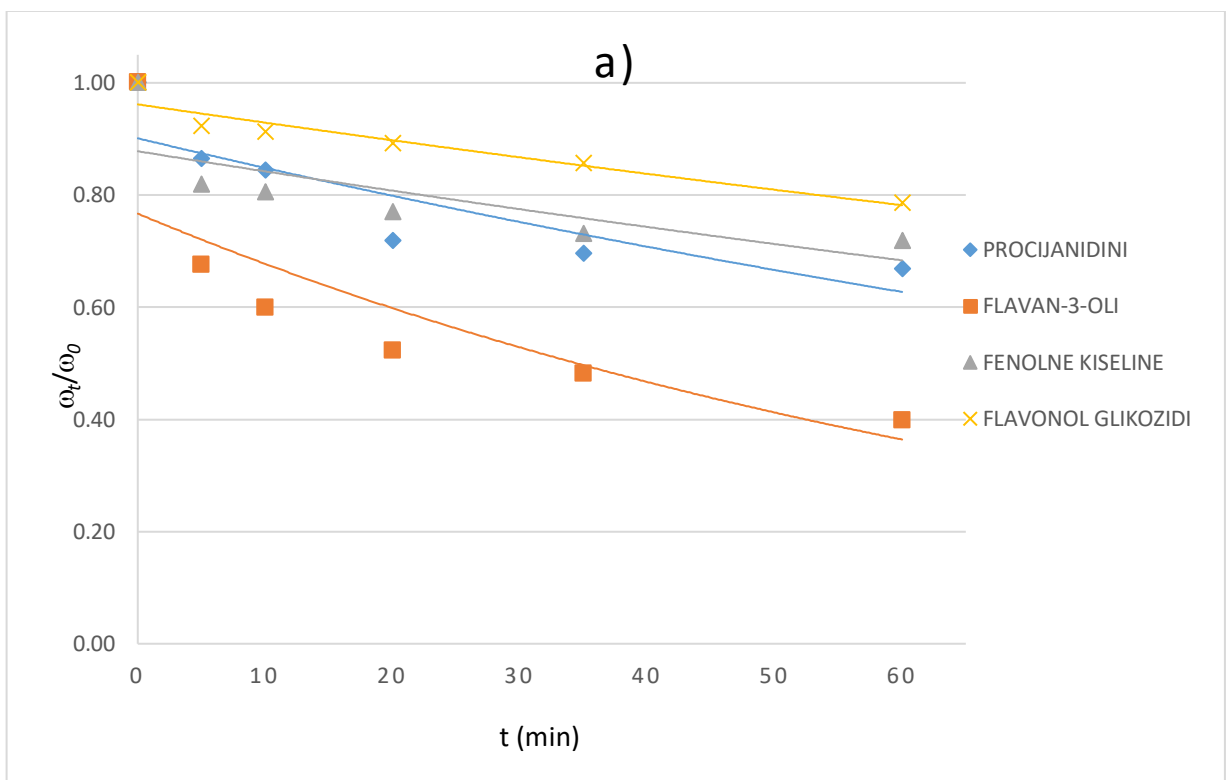
U tablici 9 prikazane su vrijednosti kinetičkih parametara k (konstanta brzine kemijske reakcije) i $t_{1/2}$ (vrijeme poluraspada) za grupe fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora izračunate prema jednadžbama [4] i [5] prilikom tretiranja na 80, 100 i 120 °C.

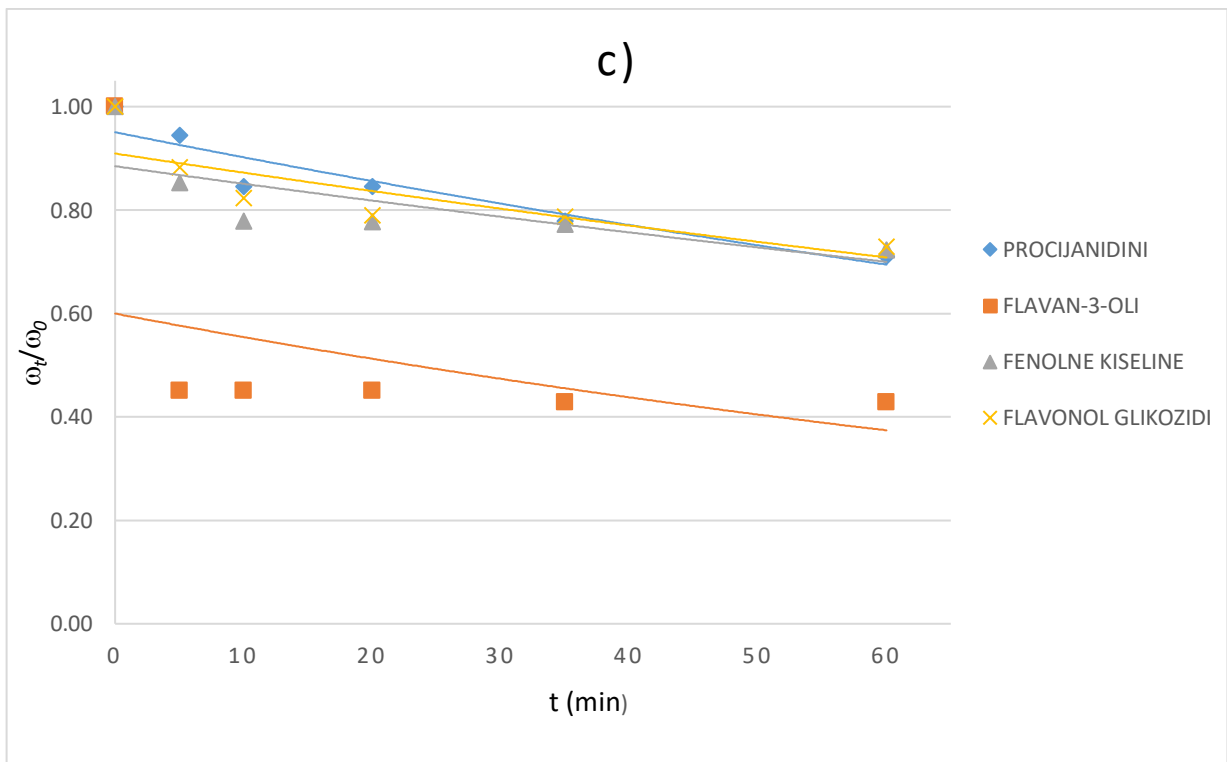
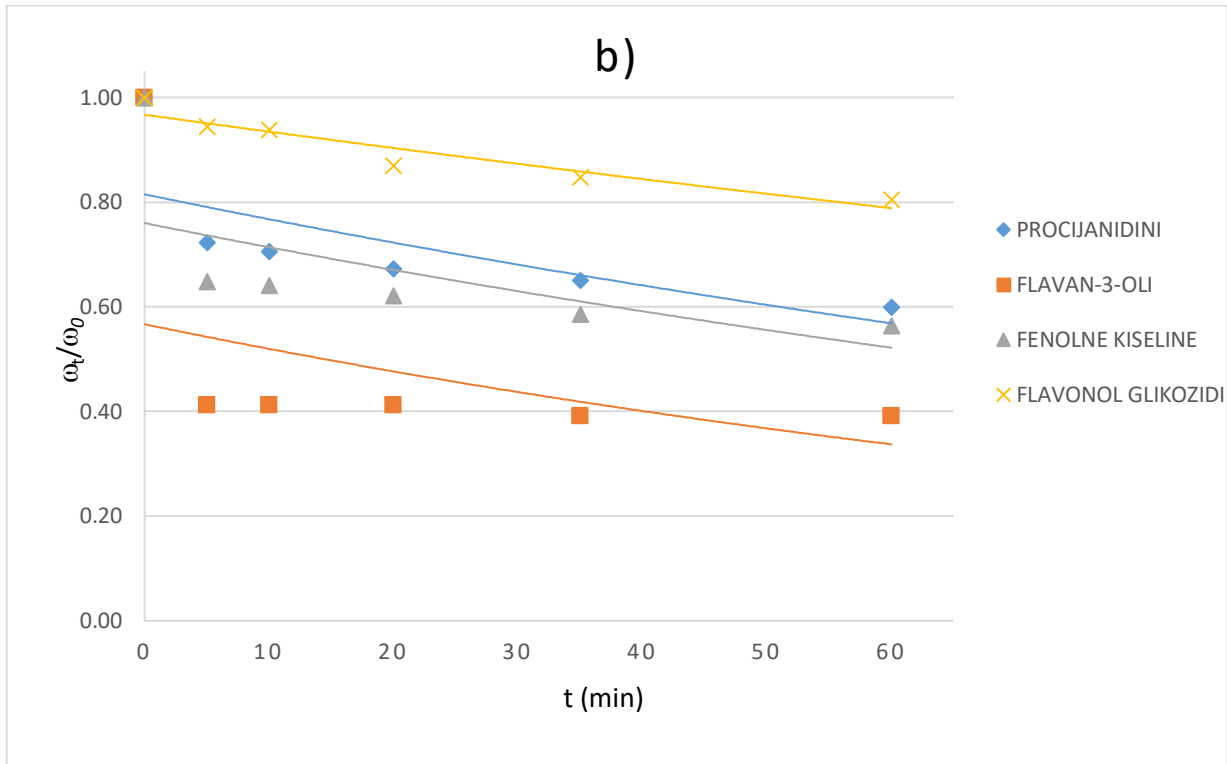
U tablici 10 predočene su vrijednosti konstante maksimalne brzine degradacije (k_0) i energije aktivacije (E_a) za grupe fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora izračunate prema jednadžbi [6] iz specifične brzine degradacije pri referentnoj temperaturi od 80 °C.



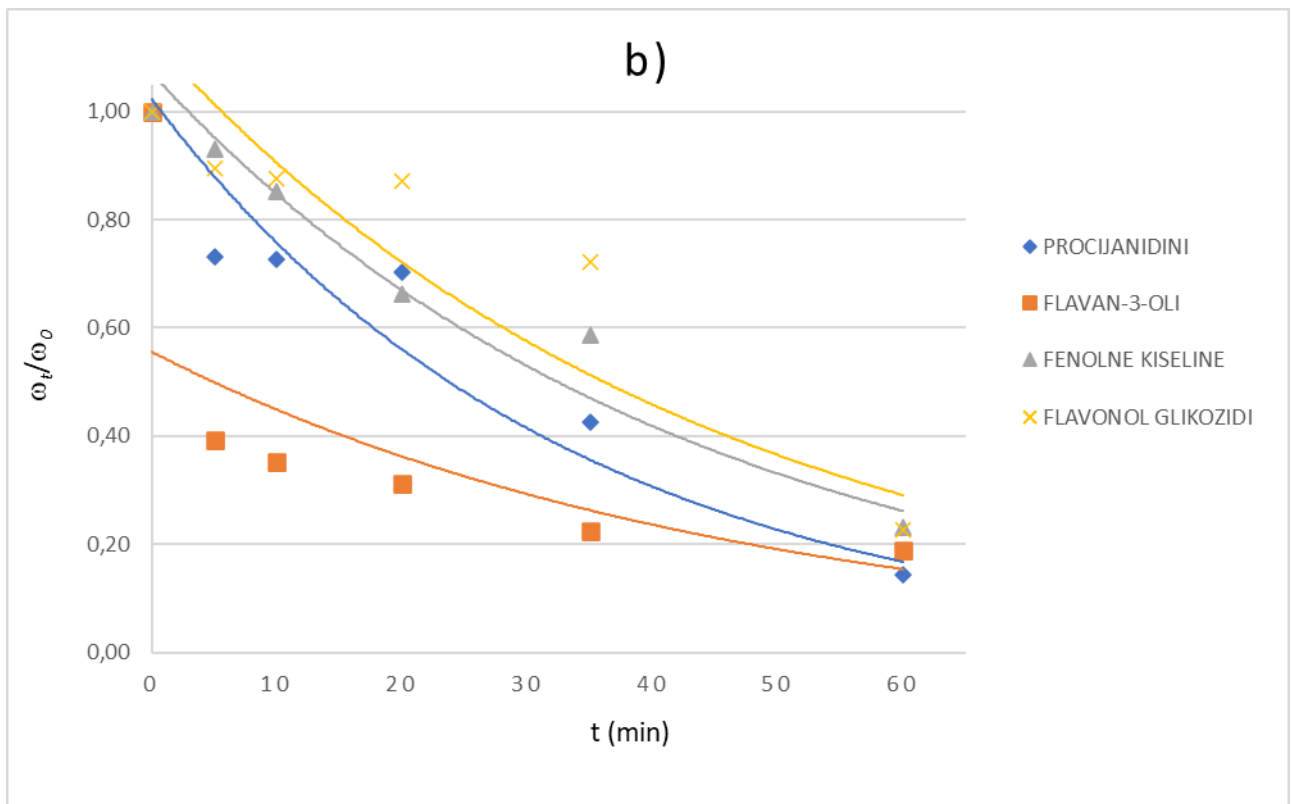
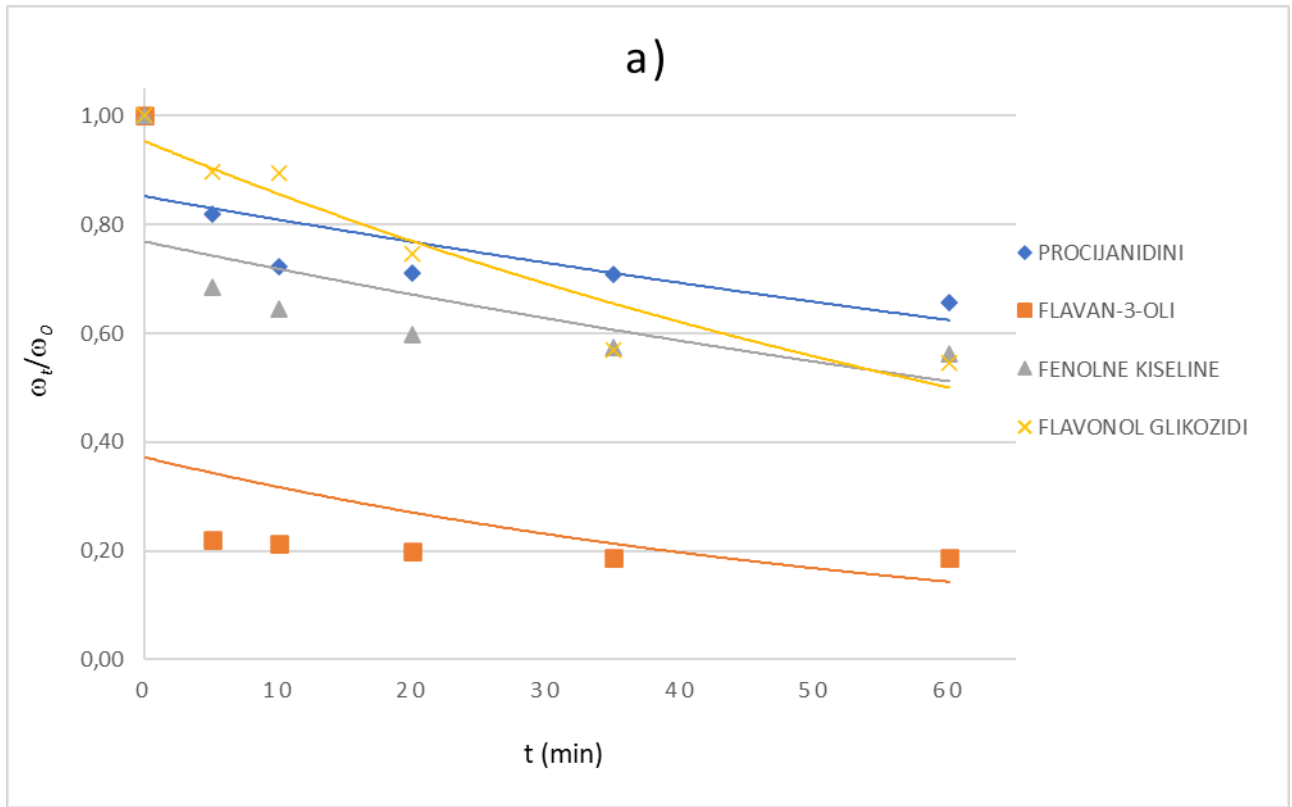


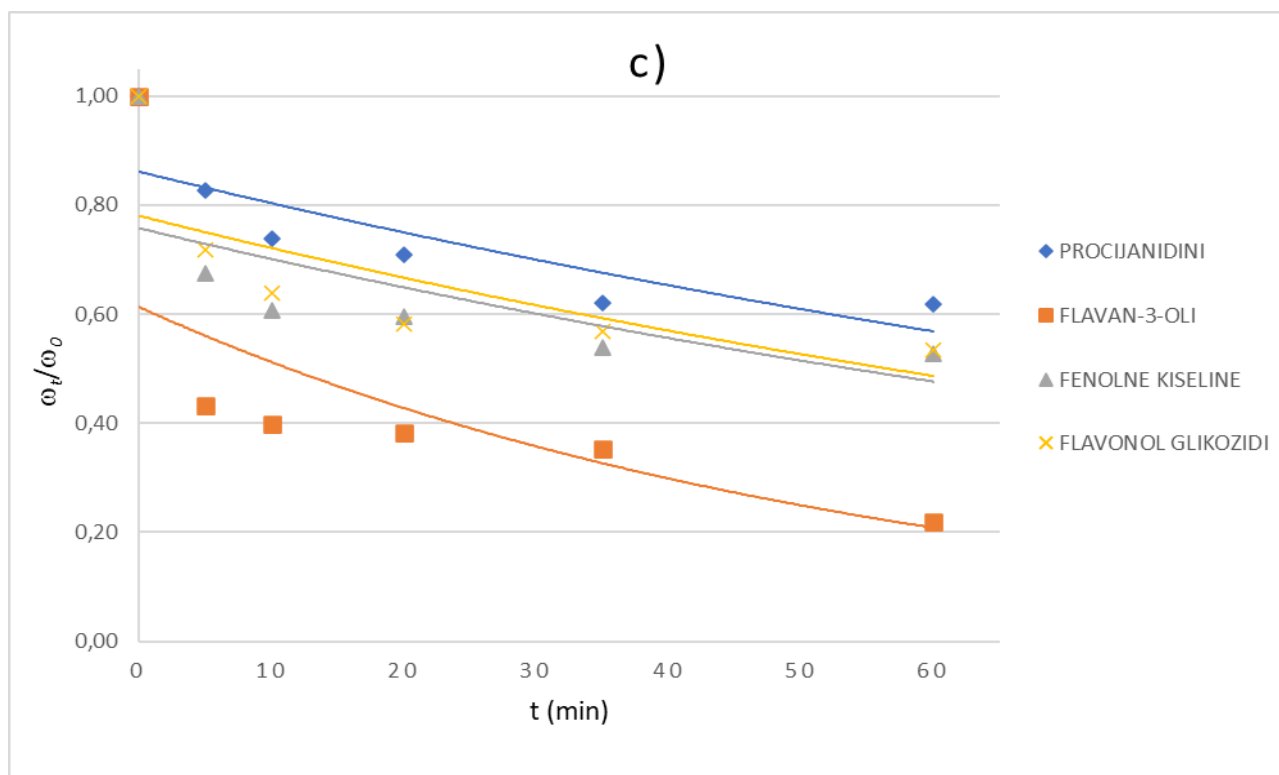
Slika 10. Degradacija fenolnih spojeva pri 80 °C u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima: a) β-CD, b) β-CD:MD i c) β-CD:GA





Slika 11. Degradacija fenolnih spojeva pri 100 °C u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima: a) β -CD, b) β -CD:MD i c) β -CD:GA





Slika 12. Degradacija fenolnih spojeva pri 120 °C u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima: a) β-CD, b) β-CD:MD i c) β-CD:GA

Tablica 9. Vrijednosti konstante brzine kemijske reakcije (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) za grupe fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima, prilikom toplinskog tretmana

| Nosač | | β-CD | | β-CD:MD | | β-CD:GA | |
|------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|
| Grupa fenolnih spojeva | Temperatura (°C) | $k \cdot 10^3$ (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) | $k \cdot 10^3$ (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) | $k \cdot 10^3$ (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) |
| Proantocijanidini | 80 | 4,537 | 152,78 | 7,599 | 91,22 | 2,385 | 290,63 |
| | 100 | 9,202 | 75,33 | 12,911 | 53,69 | 7,229 | 95,88 |
| | 120 | 10,299 | 67,30 | 26,275 | 26,38 | 12,043 | 57,56 |
| Flavan-3-oli | 80 | 16,973 | 40,84 | 21,409 | 32,38 | 5,872 | 118,04 |
| | 100 | 24,958 | 27,77 | 54,385 | 12,75 | 39,279 | 17,65 |
| | 120 | 227,749 | 3,04 | 94,296 | 7,35 | 63,111 | 10,98 |
| Fenolne kiseline | 80 | 5,537 | 125,18 | 15,129 | 45,82 | 4,033 | 171,87 |
| | 100 | 8,745 | 79,26 | 9,074 | 76,39 | 7,675 | 90,31 |
| | 120 | 16,387 | 42,30 | 18,826 | 36,82 | 19,158 | 36,18 |
| Flavonol glikozidi | 80 | 5,04 | 137,53 | 4,31 | 160,82 | 6,396 | 108,37 |
| | 100 | 4,405 | 157,35 | 4,54 | 152,68 | 7,343 | 94,40 |
| | 120 | 12,809 | 54,11 | 15,313 | 45,27 | 17,426 | 39,78 |

β-CD=β-ciklodekstrin, MD=maltodekstrin, GA=arapska guma

Tablica 10. Vrijednosti konstante maksimalne brzine degradacije (k_0) i energije aktivacije (E_a) za grupe fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima

| Nosač | β -CD | | β -CD:MD | | β -CD:GA | |
|------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| Grupa fenolnih spojeva | k_0 (min^{-1}) | E_a (kJ/mol) | k_0 (min^{-1}) | E_a (kJ/mol) | k_0 (min^{-1}) | E_a (kJ/mol) |
| Proantocijanidini | $1,43 \cdot 10^1$ | 23,657 | $1,50 \cdot 10^3$ | 35,801 | $1,95 \cdot 10^4$ | 46,729 |
| Flavan-3-oli | $2,06 \cdot 10^9$ | 74,933 | $4,56 \cdot 10^4$ | 42,786 | $8,04 \cdot 10^7$ | 68,529 |
| Fenolne kiseline | $2,37 \cdot 10^2$ | 31,312 | $1,30 \cdot 10^{-1}$ | 6,309 | $1,81 \cdot 10^4$ | 44,967 |
| Flavonol-glikozidi | $4,83 \cdot 10^1$ | 26,917 | $1,11 \cdot 10^3$ | 36,585 | $1,21 \cdot 10^2$ | 28,924 |

β -CD= β -ciklodekstrin, MD=maltodekstrin, GA=arapska guma

Rezultati određivanja kinetičkih parametara pokazali su da je najveća stabilnost svih grupa fenolnih spojeva lišća lovora osim flavonol-glikozida postignuta pri 80 °C u prahu β -CD:GA (slika 10c). Najveća stabilnost označava najmanji stupanj degradacije polifenola, odnosno najmanji pad njihovih relativnih masenih udjela što se lijepo vidi na grafičkom prikazu (slika 10c). Navedeno se može vidjeti i iz tabličnog prikaza (tablica 9) gdje se usporedbom konstanti brzina reakcije pri 80 °C za sva 3 praha za sve grupe polifenola, vidi da su te konstante najniže za prah β -CD:GA za sve grupe polifenola osim flavonol-glikozida. Što je niža konstanta brzine reakcije, to se reakcija sporije odvija. Reakcije koje su tu u fokusu su reakcije degradacije polifenola, što znači da su u datim uvjetima polifenoli sporije degradirali. Ako se na jednak način promotre i vremena poluraspada grupa polifenola, može se očitati da su ona najveća na temperaturi od 80 °C u prahu β -CD:GA za sve grupe fenolnih spojeva osim flavonol-glikozida. Ako se ima na umu da je vrijeme poluraspada vrijeme potrebno da se raspadne 50 % molekula određene grupe spojeva, tada se vidi da je ovakav rezultat u skladu s vrijednostima konstanti brzina reakcije. Što je veće vrijeme poluraspada, to je veća stabilnost određene grupe spojeva. Očekivano, toplinski tretman na najnižoj temperaturi najmanje je degradirao fenolne spojeve što je u skladu s istraživanjem Zapate i sur. (2022) koji su pratili kinetiku termičke degradacije fenolnih spojeva u lišću achiote (anatto) (*Bixa orellana* L.) te pokazali da se pri nižim temperaturama bolje očuvaju fenolni spojevi.

Za razliku od ostalih grupa fenolnih spojeva, flavonol-glikozidi su najveću stabilnost odnosno najmanju degradaciju pokazali u prahu u kojem je kao nosač korišten β -CD:MD pri 80 °C (slika 10b). Navedeno je vidljivo i iz pripadajućih kinetičkih konstanti ($k = 4,31 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$,

$t_{1/2} = 160,82$ min) (tablica 9).

Nadalje, flavonol-glikozidi su se većinski pokazali kao najstabilnija grupa fenolnih spojeva u prahovima β -CD i β -CD:MD dok su u prahu β -CD:GA to bili procijanidini.

Uočena termostabilnost flavonol-glikozida u skladu je s rezultatima istraživanja Latos-Brozio i sur. (2023) te Chaaban i sur. (2017) gdje je demonstrirano da su glikozilirani flavonoidi termorezistentniji od aglikonskih flavonoida.

Daljnijim uspoređivanjem svih grupa polifenolnih spojeva, flavan-3-oli su se pokazali kao najnestabilnija skupina spojeva. Na slikama 10, 11 i 12 očituje se njihova velika termodegradacija na sve 3 temperature u sva 3 praha osim u već spomenutom slučaju pri 80 °C u prahu β -CD:GA, gdje su sve skupine polifenola ispoljile iznimno termostabilna svojstva. Najveća vrijednost konstante maksimalne brzine degradacije i sukladno tome najveća vrijednost energije aktivacije izračunata je za flavan-3-ole u u sva 3 praha (tablica 10), što je dokaz da su flavan-3-oli izrazito termolabilni. Što je veća vrijednost konstante maksimalne brzine degradacije (k_0), to će spojevi brže i više degradirati, odnosno što je veća energija aktivacije (E_a), to je veća osjetljivost brzine reakcije o temperaturi. Uzimajući u obzir ove parametre, može se zaključiti da su flavan-3-oli vrlo osjetljivi na povišenu temperaturu te su najbrže i najviše degradirali od svih grupa spojeva u većini promatranih slučajeva.

Razlog tome može biti nukleofilnost aromatskog A-prstena u kemijskoj strukturi flavan-3-ola (slika 3) koja je zaslužna za njihovu reaktivnost. Tako primjerice može doći do polimerizacije monomera flavan-3-ola u proantocijanidine. Flavan-3-oli su podložni i enzimskom posmeđivanju – oksidaciji, uz enzim polifenol-oksidadu (Es-Safi i sur., 2008). Izloženost flavan-3-ola povišenim temperaturama uzrokuje i degradacijske reakcije epimerizacije i hidrolize (Aksoylu i Karakaya, 2013).

Temperatura pri kojoj je došlo do najveće degradacije grupa fenolnih spojeva je 120 °C (slika 12). Ovo se može iščitati i iz tablice 6 promatrajući kinetičke parametre za $t = 120$ °C te ih uspoređujući s istim parametrima za preostale dvije temperature. Vidi se da su konstante brzine reakcije pri 120 °C najveće, a vremena poluraspada najkraća za sve grupe fenolnih spojeva u sva 3 praha. Rezultati također pokazuju da vrijeme tretiranja itekako utječe na degradaciju fenolnih spojeva. Termodegradacija svih skupina fenolnih spojeva, a posebice flavan-3-ola vidljiva je već nakon samo 5 min toplinskog tretmana. Što je duži toplinski tretman, to je veća degradacija pa je najveća degradacija zabilježena nakon 60 min tretmana kod gotovo svih uzoraka prahova.

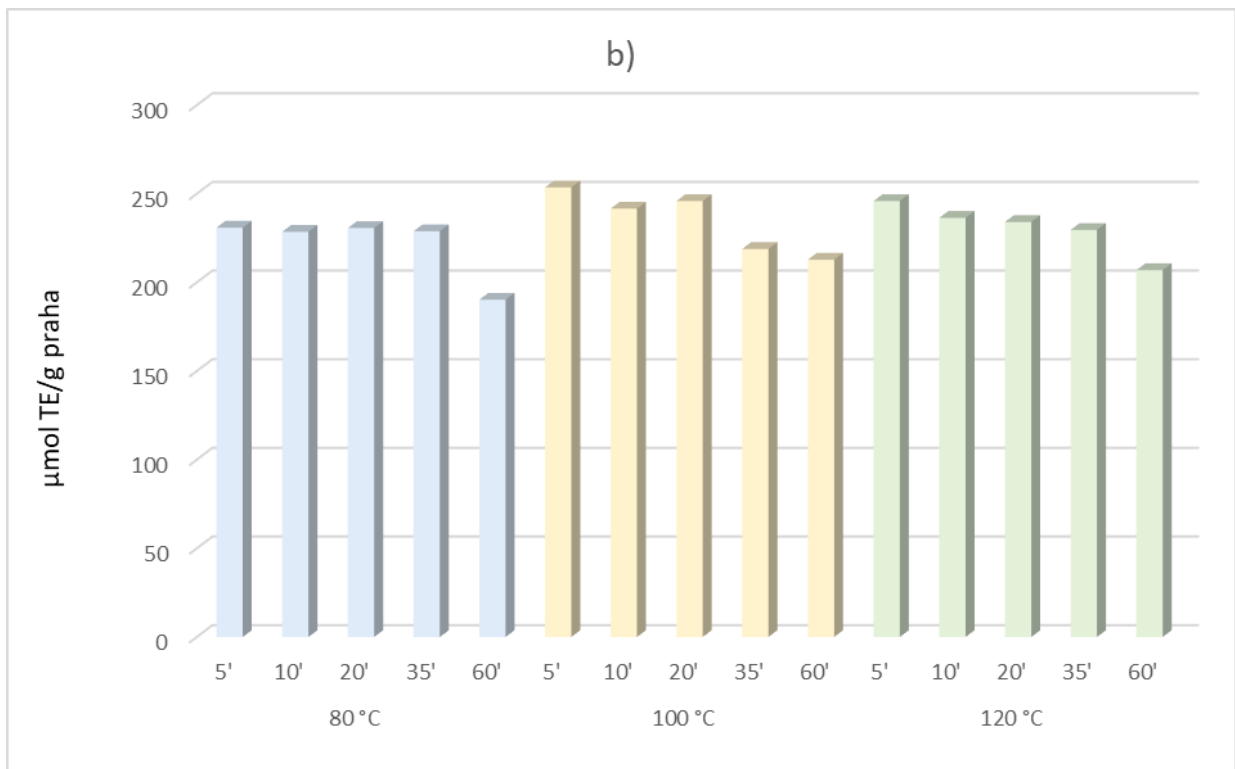
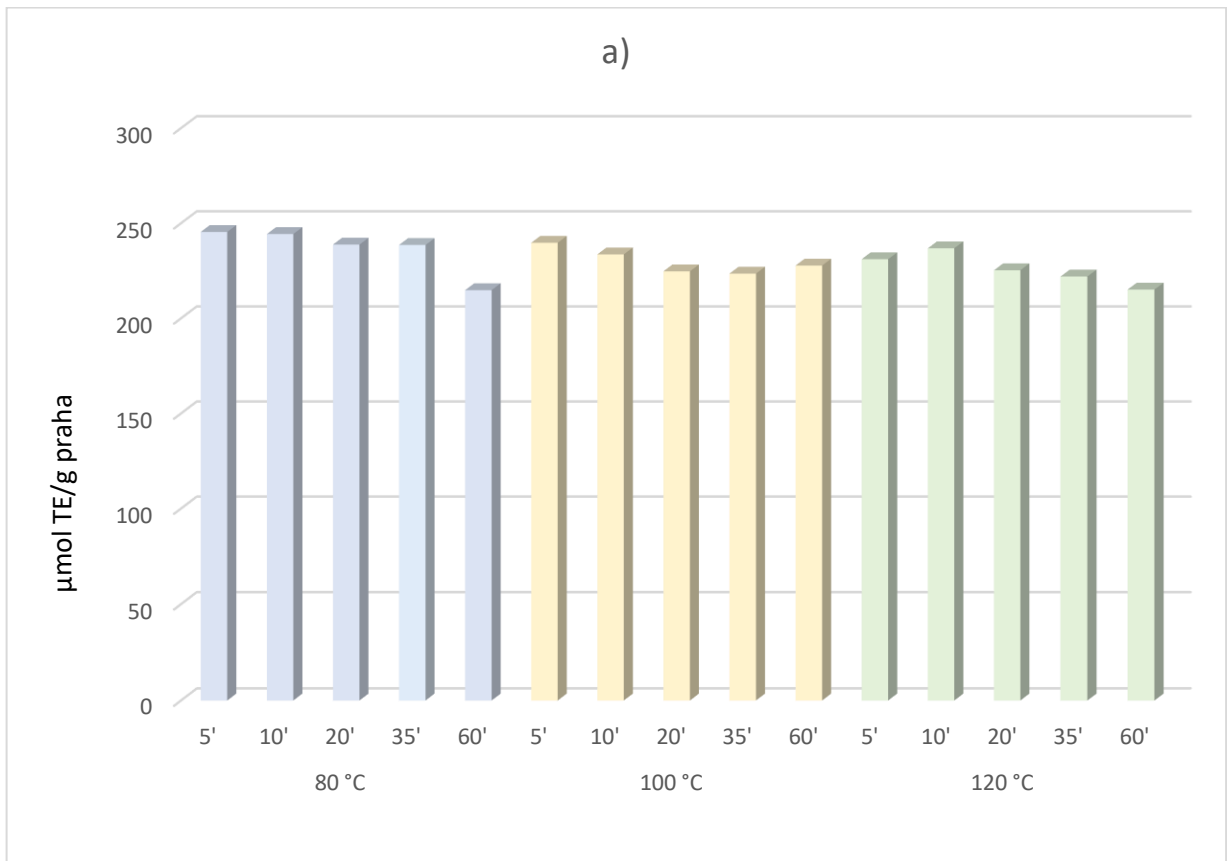
Ovakvi rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Snoussi i sur. (2022) koji su pratili kinetiku toplinske degradacije etanolnog ekstrakta lišća mirte (*Myrtus communis* L.) te zaključili da što je veća temperatura i duže vrijeme toplinskog tretmana, to je veća degradacija i gubitak fenolnih spojeva.

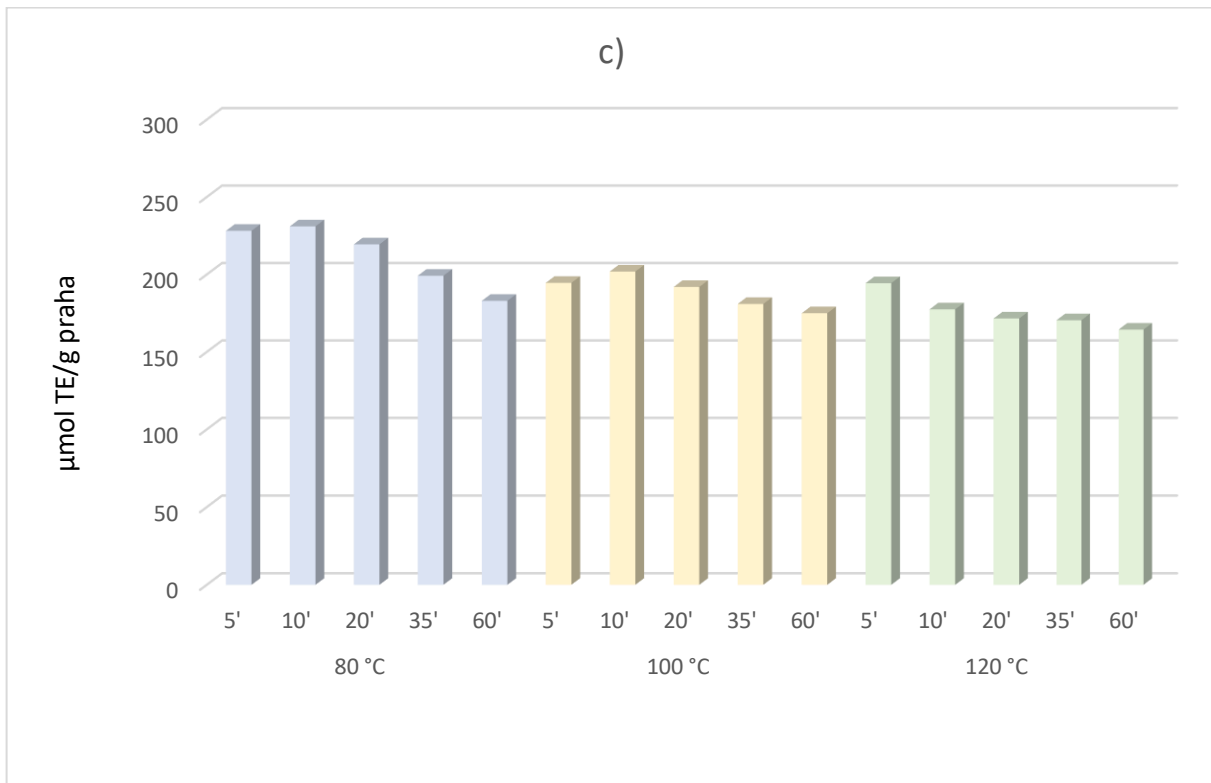
Nosač, odnosno kombinacija nosača koja je pokazala najbolja inkapsulirajuća svojstva odnosno najbolju zaštitu polifenolnih spojeva pri izlaganju povišenim temperaturama je kombinacija β -CD:GA. Ovo vrijedi za sve promatrane skupine polifenola osim za flavonol-glikozide koji su nešto veću stabilnost postigli kada se kao nosač koristio β -CD te kombinacija β -CD:MD.

Gharsallaoui i sur. (2007) tvrde da jedan nosač ne posjeduje sve potrebne osobine za učinkovitu enkapsulaciju te da je zato kombinacija dvaju ili više nosača bolji izbor za učinkovitiju zaštitu enkapsuliranih spojeva. Kad se pri sušenju raspršivanjem koristi kombinacija nosača, postiže se bolje zadržavanje fenolnih spojeva zaključuju istraživanja Toluna i sur. (2016) te Pérez-Alonsa i sur. (2003). Klein i sur. (2010) tvrde da međusobne interakcije između više različitih nosača mogu stvoriti komplekse s međufaznim i amfifilnim svojstvima, čime se poboljšava učinkovitost inkapsulacije. Istraživanje koje su proveli Fishi i sur. (2023) ispitivalo je utjecaj MD i GA na fizikalno-kemijska svojstva praha ekstrakta stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) proizvedenog sušenjem vakuumom te se ispostavilo da GA bolje štiti bioaktivne molekule u prahu ekstrakta stevije od MD, odnosno da se pomoću nje proizvede puno stabilniji prah ekstrakta. Ovo objašnjava zašto se kombinacija β -CD:GA pokazala boljom od kombinacije β -CD:MD za zaštitu većine promatranih grupa polifenola.

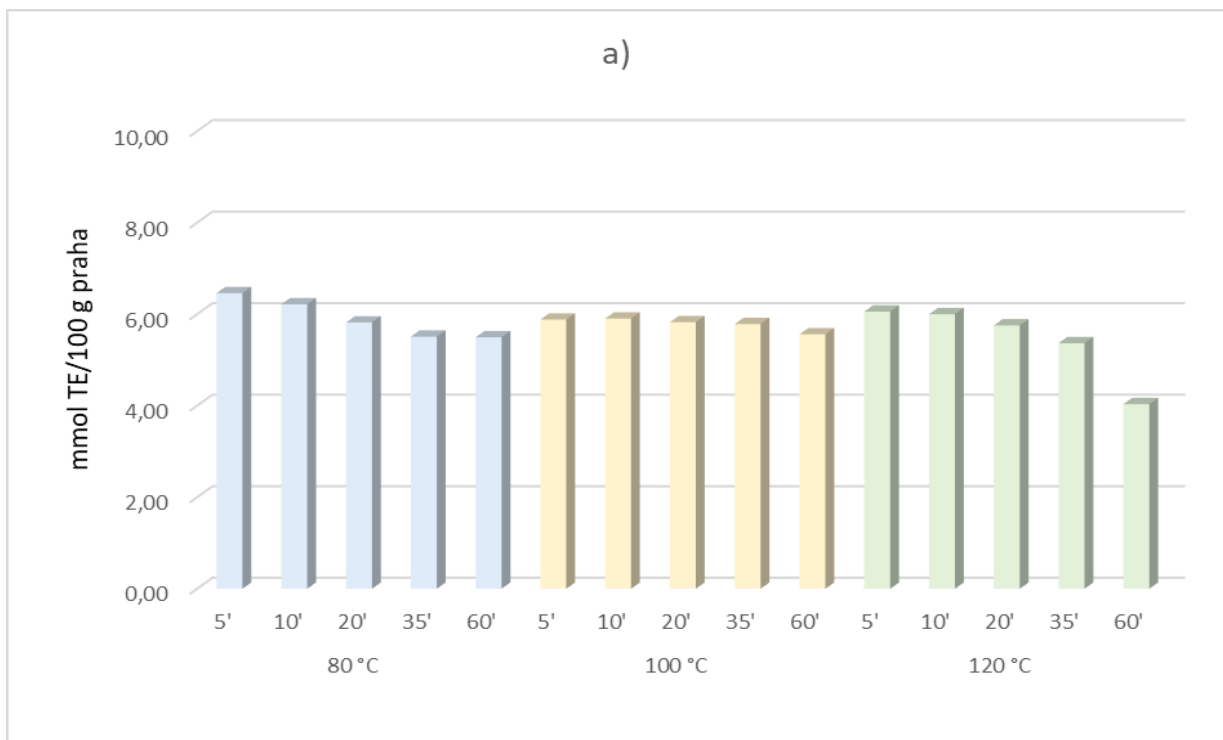
4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET PRAHOVA EKSTRAKTA LOVORA – DPPH I ABTS METODA

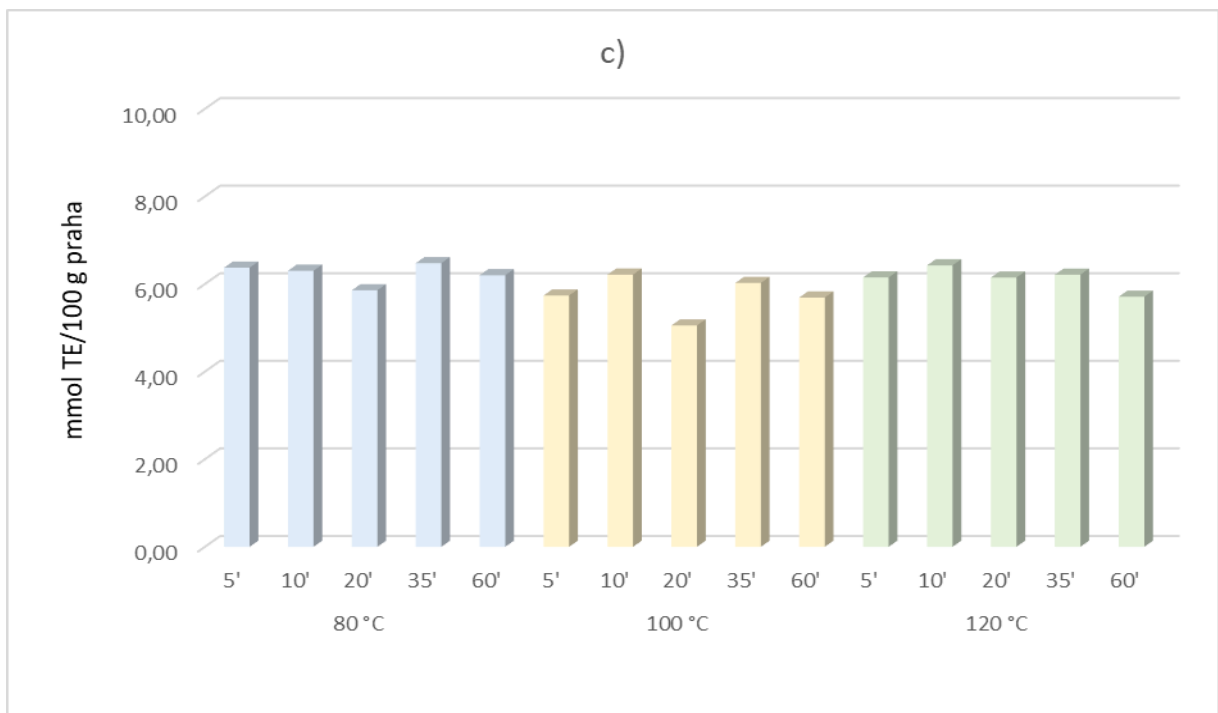
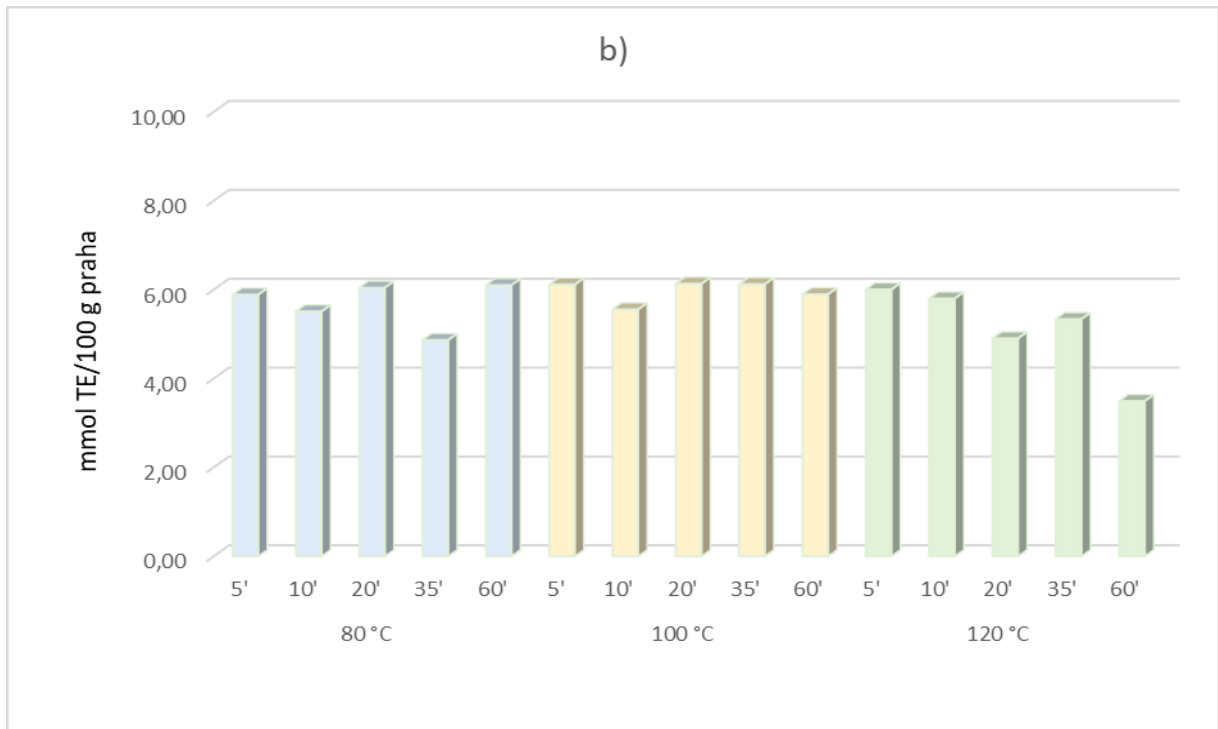
Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta (AOC) prahova ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima te izloženih vremenski različitom toplinskom tretmanu, grafički su prikazani na slici 13 (DPPH metoda) te na slici 14 (ABTS metoda).





Slika 13. Utjecaj temperature i vremena tretiranja na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima: a) β -CD, b) β -CD:MD i c) β -CD:GA





Slika 14. Utjecaj temperature i vremena tretiranja na antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom u prahovima ekstrakta lovora proizvedenih s različitim nosačima: a) β -CD, b) β -CD:MD i c) β -CD:GA

Rezultati određivanja AOC prahova ekstrakta lovora DPPH i ABTS metodom pokazali su relativnu stabilnost AOC u svim prahovima tijekom vremenski različitog toplinskog tretmana pri sve 3 temperature. S obzirom da su fenolni spojevi poznati kao dobri antioksidansi, očekivalo bi se da će se s njihovom termičkom degradacijom smanjiti i antioksidacijska aktivnost. Međutim takav trend je tek djelomično vidljiv u ovom istraživanju, a najočitiji je gledajući razlike u vremenskom intervalu izlaganja od 5 i 60 min (slike 13 i 14). Može se uočiti i da je u određenim vremenskim intervalima došlo do porasta AOC prilikom toplinskog tretmana što se može objasniti pojavom Maillardovih reakcija pri povišenim temperaturama, dovodeći do stvaranja spojeva s antioksidacijskom aktivnošću (Ferrari i sur., 2013). S druge strane, neke studije su pokazale da produkti Maillardovih reakcija mogu interferirati pri određivanju fenolnih spojeva i procjeni AOC (Khodja i sur., 2020; Pérez-Burillo i sur., 2019; Mondaca-Navarro i sur., 2017).

Rezultati određivanja AOC DPPH metodom demonstrirali su da su prahovi ekstrakta lovora proizvedeni s nosačem β -CD te kombinacijom nosača β -CD:MD imali viši AOC od praha proizvedenog s nosačem β -CD:GA. Rezultati određivanja AOC ABTS metodom pokazali su da nema značajnije razlike u AOC prahova u ovisnosti o korištenom nosaču. U istraživanju Dobroslavić i sur. (2023) promatran je među ostalim i AOC prahova ekstrakta lovora proizvedenih sušenjem raspršivanjem na 180 °C na jednak način kao i u ovom istraživanju, ali bez izlaganja prahova naknadnom toplinskom tretmanu. Korištene su 3 metode (DPPH, FRAP i ORAC) te je svim metodama utvrđen najveći AOC praha β -CD:MD. Zaključak rezultata istraživanja je da nisu samo polifenoli lišća lovora odgovorni za AOC, već i drugi spojevi s antioksidacijskim djelovanjem kao klorofil i masne kiseline. Vrlo je vjerojatno da su se ovi spojevi efikasnije inkapsulirali u prah β -CD:MD zbog različite kemijske strukture ovih nosača i posljedično raznolikih mehanizama vezanja. U studiji Furute i Neoha (2021) pokazano je da korištenje kombinacije nosača prilikom inkapsulacije sušenjem raspršivanjem, rezultira u većem AOC biljnih ekstrakata, a MD se pokazao efikasnijim u enkapsulaciji klorofila od GA. Ferrari i sur. (2013) su za proizvodnju praha kupine sušenjem raspršivanjem koristili MD, GA te njihovu kombinaciju. Rezultati određivanja AOC skladištenih prahova pri 25 i 35 °C tijekom 5 mjeseci pokazali su da je bolje očuvanje antioksidacijskog potencijala u prahovima u kojima se kao nosač koristio MD te kombinacija MD:GA.

U istraživanju Snoussija i sur. (2022) određivan je među ostalim i AOC etanolnog ekstrakta lišća mirte (*Myrtus communis* L.) u acetatnom puferu, pri toplinskom tretmanu pri 3

temperature (70, 90 i 100 °C) u vremenskom periodu 0-120 min. Korištene su DPPH i ABTS metoda. Rezultati određivanja AOC ABTS metodom pokazali su da je AOC ostao relativno stabilan tijekom toplinskog tretmana što se poklapa s rezultatima ovog istraživanja. Određivanje AOC DPPH metodom rezultiralo je padom AOC s povećanom temperaturom tijekom termičkog tretmana. Autori su diskriminativnom analizom utvrdili da neki drugi faktori osim temperature i vremena toplinskog tretmana, mogu imati manji utjecaj na vrijednosti antioksidacijskih testova.

Nije iznenađujuće da su obe korištene metode za određivanje AOC (DPPH i ABTS) prikazale slične rezultate, jer obe metode dijele osnovni mehanizam za detekciju AOC. Limmongkon i sur. (2017) tvrde da nijedna metoda ne može precizno izmjeriti ukupni AOC pošto različite metode otkrivaju različite aspekte antioksidacijskog ponašanja. Stoga, procjena općeg antioksidacijskog djelovanja može zahtijevati više testova kako bi se dobio sveobuhvatan antioksidacijski profil biljnih ekstrakata (de Vilela Silva i sur., 2023).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i obrađenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Degradacija fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta lišća lovora tijekom toplinske obrade pri različitim temperaturama slijedi kinetiku prvog reda. Na temelju kinetičkih parametara [konstanta brzine kemijske reakcije (k) i vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$), energija aktivacije (E_a) i konstanta maksimalne brzine degradacije (k_0)] flavan-3-oli su najnestabilnija grupa spojeva, odnosno pokazuju najveću degradaciju tijekom toplinskog tretmana u svim prahovima.
2. Flavonol-glikozidi najstabilnija su grupa polifenola u prahovima u kojima su kao nosači korišteni β -CD i β -CD:MD, dok su u prahu β -CD:GA to proantocijanidini.
3. Fenolne kiseline, flavan-3-oli i proantocijanidini najmanju degradaciju tj. najveću stabilnost pokazali su pri 80 °C u prahu β -CD:GA, dok su flavonol-glikozidi najveću stabilnost pokazali pri 80 °C u prahu β -CD:MD [najmanje konstante brzine kemijske reakcije (k) i najveća vremena poluraspada ($t_{1/2}$)].
4. Što je veća temperatura i duže vrijeme toplinskog tretmana, to je veća degradacija fenolnih spojeva.
5. Kombinacija nosača koja je pokazala najbolja inkapsulirajuća svojstva tj. najbolju zaštitu proantocijanidina, fenolnih kiselina te flavan-3-ola pri izlaganju povišenim temperaturama je kombinacija β -CD:GA. Flavonol-glikozidi su nešto veću stabilnost postigli kada se kao nosač koristio β -CD te kombinacija β -CD:MD.
6. Antioksidacijski kapacitet (AOC) prahova ekstrakta lišća lovora određen DPPH i ABTS metodom relativno je stabilan u svim prahovima pri sve 3 temperature tijekom cijelog toplinskog tretmana u obe metode.
7. AOC određen DPPH metodom demonstrira da prahovi ekstrakta lišća lovora proizvedeni s nosačem β -CD te kombinacijom nosača β -CD:MD imaju veći AOC od praha proizvedenog s nosačem β -CD:GA. AOC određen ABTS metodom prikazuje da nema značajnije razlike u AOC prahova u ovisnosti o korištenom nosaču.

6. LITERATURA

Aguiar J, Estevinho BN, Santos L (2016) Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends Food Sci Technol* **58**, 21-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012>

Aksoylu Z, Karakaya S (2013) Effect of Food Processing on Flavanols. *Acad Food J* **11**, 70-79.

Alejo-Armijo A, Altarejos J, Salido S (2017) Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*). *Nat Prod Commun* **12**, 743-757. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200519>

Alvani K, Qi X, Tester R (2011) Use of carbohydrates, including dextrans for oral delivery. *Starch-Stärke* **63**, 424–431. <https://doi.org/10.1002/star.201000110>

Assadpour E, Jafari SM, Maghsoudlou Y (2017) Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *Int J Biol Macromol* **95**, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023>

Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll* **23**, 1631–1640. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>

Attokaran M (2017) Natural Food Flavours and Colorants, 2. izd., Wiley & Blackwell, Hoboken, str. 74-77.

Batool S, Khera RA, Hanif MA, Ayub MA (2020) Chapter 5 – Bay Leaf. U: Hanif MA, Nawaz H, Khan MM, Byrne HJ (ured.) Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery, Elsevier, Amsterdam, str. 63-74.

Bié J, Sepodes B, Fernandes PCB, Ribeiro MHL (2023) Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds* **3**, 40-72. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>

Bozan B, Karakaplan U (2007) Antioxidants from laurel (*Laurus nobilis* L.) berries: Influence of extraction procedure on yield and antioxidant activity of extracts. *Acta Aliment Hung* **36**, 321-328. <https://doi.org/10.1556/aalim.36.2007.3.4>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Busch VM, Pereyra-Gonzalez A, Šegatin N, Santagapita PR, Poklar Ulrih N, Buera MP (2017) Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *LWT - Food Sci Technol* **75**, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.055>

Chaaban H, Ioannou I, Chebil L, Slimane M, Gérardin C, Paris C, i sur. (2017) Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J Food Process Pres* **41**, e13203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>

Dag D, Kilercioglu M, Oztop MH (2017) Physical and chemical characteristics of encapsulated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice powder. *LWT - Food Sci Technol* **83**, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.007>

de Paulo Farias D, de Araújo FF, Neri-Numa IA, Pastore GM (2021) Antidiabetic potential of dietary polyphenols: A mechanistic review. *Food Res Int* **145**, 110383. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110383>

de Souza JRR, Feitosa JPA, Ricardo NMPS, Trevisan MTS, de Paula HCB, Ulrich CM, i sur. (2013) Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. *Food Hydrocoll* **33**, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.017>

de Vilela Silva ET, de Queiroz AJM, de Figueirêdo RMF, Moura HV, dos Santos FS, de França Silva AP, i sur. (2023) Dynamic modelling of degradation kinetics of phenolic compounds, phenolic profiles, mineral content, and overall antioxidant capacity of germinated peanut flours. *LWT* **18**, 114927. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114927>

Devi N, Sarmah M, Khatun B, Maji TK (2017) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Adv Colloid Interface Sci* **239**, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>

Dias MI, Barros L, Dueñas M, Alves RC, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, i sur. (2014) Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chem* **156**, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.122>

Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS, Cabezudo MD (2002) Effect of Drying Method on the Volatiles in Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.). *J Agric Food Chem* **50**, 4520–4524. <https://doi.org/10.1021/jf011573d>

Dobrosłavić E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V (2021) Polyphenolic Characterization and Antioxidant Capacity of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts Obtained by Green and Conventional Extraction Techniques. *Processes* **9**, 1840. <https://doi.org/10.3390/pr9101840>

Dobrosłavić E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Roje M, Dragović-Uzelac V (2023) Physicochemical Properties, Antioxidant Capacity, and Bioavailability of *Laurus nobilis* L. Leaf Polyphenolic Extracts Microencapsulated by Spray Drying. *Foods* **12**, 1923. <https://doi.org/10.3390/foods12091923>

Dobrosłavić E, Repajić M, Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I (2022) Isolation of *Laurus nobilis* Leaf Polyphenols: A Review on Current Techniques and Future Perspectives. *Foods* **11**, 235. <https://doi.org/10.3390/foods11020235>

Duchêne D, Bochot A (2016) Thirty years with cyclodextrins. *Int J Pharm* **514**, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030>

Elmastaş M, Gülçin I, Işildak Ö, Küfrevioğlu Ö, İbaoglu K, Aboul-Enein H (2006) Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *J Iran Chem Soc* **3**, 258-266. <https://doi.org/10.1007/BF03247217>

Es-Safi NE, Ghidouche S, Ducrot PH (2007) Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules* **12**, 2228-2258. <https://doi.org/10.3390/12092228>

Farha AK, Yang QQ, Kim G, Li HB, Zhu F, Liu HY, i sur. (2020) Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Biosci* **38**, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>

Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M (2012) Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Technol* **23**, 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>

Ferrari CC, Germer SPM, Alvim ID, de Aguirre JM (2013) Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Dry Technol* **31**, 470-478. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.742103>

Fishi ANA, Nurhadi B, Mahani M, Saputra RA (2023) The effect of Arabic gum and maltodextrin on the physicochemical properties of vacuum-dried stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) extract powder. *Food Res* **7**, 244-255. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.7\(1\).738](https://doi.org/10.26656/fr.2017.7(1).738)

Furuta T, Neoh TL (2021) Microencapsulation of food bioactive components by spray drying: A review. *Dry Technol* **39**, 1800-1831. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1862181>

Idham Z, Muhamad II, Sarmidi MR (2012) Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. *J Food Process Eng* **35**, 522-542. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x>

Jacobs IC (2014) Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide, Academic Press, Cambridge, str. 47-56.

Jain A, Thakur D, Ghoshal G, Katare OP, Shivhare US (2016) Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *Int J Biol Macromol* **87**, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.117>

Jia Z, Dumont MJ, Orsat V (2016) Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Biosci* **15**, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**, 2328-2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>

Khodja YK, Dahmoune F, Bachir bey M, Madani K, Khettal B (2020) Conventional method and microwave drying kinetics of *Laurus nobilis* leaves: effects on phenolic compounds and antioxidant activity. *Braz J Food Technol* **23**, 201-214. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.21419>

Klein JM, Aserin A, Ishai PB, Garti N (2010) Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloid Surface B* **79**, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.021>

Konovalov DA, Alieva NM (2019) Phenolic compounds of *Laurus nobilis* (Review). *Pharm Pharmacol* **7**, 244–259. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-5-244-259>

Lago CC, Noreña CPZ (2017) Thermodynamic and kinetics study of phenolics degradation and color of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) microparticles under accelerated storage conditions. *J Food Sci Technol* **54**, 4197-4204. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2887-y>

Latos-Brozio M, Masek A, Piotrowska M (2023) Effect of enzymatic polymerization on the thermal stability of flavonoids. *J Therm Anal Calorim* **148**, 5357-5374. <https://doi.org/10.1007/s10973-023-12089-1>

Lević S, Pajić Lijaković I, Dorević V, Rac V, Rakić V, Šolević Knudsen T, i sur. (2015) Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocoll* **45**, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.001>

Li W, Chen H, Xu B, Wang Y, Zhang C, Cao Y, i sur. (2023) Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. *J Future Foods* **3**, 289-305. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.001>

Limmongkon A, Janhom P, Amthong A, Kawpanuk M, Nopprang P, Poohadsuan J, i sur. (2017) Antioxidant activity, total phenolic, and resveratrol content in five cultivars of peanut sprouts. *Asian Pac J Trop Med* **7**, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.002>

Mariod AA (2018) Gum Arabic: Structure, Properties, Applications and Economics, Academic Press, Cambridge, str. 283-295.

Mohd Roby BH, Muhialdin BJ, Abadl MMT, Mat Nor NA, Marzlan AA, Lim SAH, i sur. (2020) Physical properties, storage stability, and consumer acceptability for sourdough bread produced using encapsulated kombucha sourdough starter culture. *J Food Sci* **85**, 2286-2295. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15302>

Mohsin AZ, Mat Nor NA, Muhialdin BJ, Mohd Roby BH, Abadl MM, Marzlan AA, i sur. (2022) The effects of encapsulation process involving arabic gum on the metabolites, antioxidant and antibacterial activity of kombucha (fermented sugared tea). *Food Hydrocoll Health* **2**, 10072. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100072>

Mondaca-Navarro BA, Ávila-Villa LA, González-Córdova AF, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Campas-Baypoli ON, i sur. (2017) Antioxidant and chelating capacity of Maillard reaction products in amino acid-sugar model systems: applications for food processing. *J Sci Food Agr* **97**, 3522-3529. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8206>

Mujumdar A (2007) Handbook of Industrial Drying, 3.izd., CRC Press, Boca Raton, str. 215-217.

Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V (2013) Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Ind Crops Prod* **42**, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>

Nishimoto-Sauceda D, Romero-Robles LE, Antunes-Ricardo M (2021) Biopolymer nanoparticles: a strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients. *J Sci Food Agric* **102**, 41-52. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11512>

Nogueira MH, Tavares GM, Casanova F, Silva CR, Rocha JC, Stringheta PC, i sur. (2020) Cross-linked casein micelle used as encapsulating agent for Jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) phenolic compounds by spray drying. *Int J Dairy Technol* **73**, 765–770. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12704>

O'Toole MG, Henderson RM, Soucy PA, Fasciotto BH, Hoblitzell PJ, Keynton RS, i sur. (2012) Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/Tween 20 particles. *Biomacromolecules* **13**, 2309–2314. <https://doi.org/10.1021/bm300564v>

Ortega N, Romero MP, Macià M, Reguant J, Anglès N, Morelló JR, i sur. (2010) Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *J Food Compos Anal* **23**, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.005>

Özcan M, Chalchat JC (2005) Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaves Growing Wild in Turkey. *J Med Food* **8**, 408-411. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.408>

Patrakar R, Mansuriya M, Patil P (2012) Phytochemical and pharmacological review on *Laurus nobilis*. *Int J Pharm Chem Sci* **1**, 595-602.

Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Tech* **21**, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>

Pérez-Alonso C, Báez-González JG, Beristain CI, Vernon-Carter EJ, Vizcarra-Mendoza MG (2003) Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr Polym* **53**, 197-203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00052-3)

Pérez-Burillo S, Rufián-Henares JÁ, Pastoriza S (2019) Effect of home cooking on the antioxidant capacity of vegetables: Relationship with Maillard reaction indicators. *Food Res Int* **121**, 514-523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.007>

Prajapati VD, Jani GK, Moradiya NG, Randeria NP (2013) Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydr Polym* **92**, 1685–1699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>

Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Rahaiee S, Assadpour E, Faridi Esfanjani A, Silva AS, Jafari SM (2020) Application of nano/microencapsulated phenolic compounds against cancer. *Adv Colloid Interface Sci* **279**, 102153. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102153>

Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R (2016) An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci* **13**, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Robbins RJ (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem* **51**, 2866-2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

Robin AL, Sankhla D (2013) European legislative framework controlling the use of food additives. U: Saltmarsh M (ured.) Essential guide to food additives, 3. izd., RSC Publishing, Cambridge, str. 44-53.

Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B (2016) Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Res Int* **83**, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>

Shishir MRI, Chen W (2017) Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci Technol* **65**, 49-67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>

Shishir MRI, Taip FS, Aziz NA, Talib RA, Sarker MSH (2016) Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. *Food Sci Biotechnol* **25**, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0064-0>

Siddiqui SS, Rahman S, Rupasinghe HPV, Vazhappilly CG (2020) Dietary Flavonoids in p53—Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention. *Biomedicines* **8**, 286. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080286>

Snoussi A, Bouacida S, Mitić M, Arsić B, Koubaier HBH, Chouaibi M, i sur. (2022) Thermal degradation kinetics of myrtle leaves ethanol extract (*Myrtus communis* L.): effect on phenolic compounds content and antioxidant activity. *Food Measure* **16**, 2119–2130. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01341-1>

Sun C, Zhao C, Guven EC, Paoli P, Simal-Gandara J, Ramkumar KM, i sur. (2020) Dietary polyphenols as antidiabetic agents: advances and opportunities. *Food Front* **1**, 18-44. <https://doi.org/10.1002/fft2.15>

Tolun A, Altintas Z, Artik N (2016) Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J Biotechnol* **239**, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>

Tonon RV, Brabet C, Pallet D, Brat P, Hubinger MD (2009) Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *Int J Food Sci Technol* **44**, 1950–1958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x>

Verbeyst L, Oey I, Van der Plancken I, Hendrickx M, Van Loey A (2010) Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chem* **123**, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.027>

Wan MLY, Co VA, El-Nezami H (2021) Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. *Crit Rev Food Sci* **61**, 690-711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1744512>

Yang H, Feng K, Wen P, Zong MH, Lou WY, Wu H (2017) Enhancing oxidative stability of encapsulated fish oil by incorporation of ferulic acid into electrospun zein mat. *LWT- Food Sci Technol* **84**, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.045>

Yao ZC, Chang MW, Ahmad Z, Li JS (2016) Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. *J Food Eng* **191**, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.012>

Zapata JE, Sepúlveda CT, Álvarez AC (2022) Kinetics of the thermal degradation of phenolic compounds from achiote leaves (*Bixa orellana* L.) and its effect on the antioxidant activity. *Food Sci Tech-Brazil* **42**, e30920. <https://doi.org/10.1590/fst.30920>

Zhang J, Zhang C, Chen X, Quek SY (2019) Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. *J Food Eng* **269**, 109744. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109744>

Zorić Z (2014) Stabilnost biološki aktivnih spojeva dehidratiranih proizvoda višnje Maraske tijekom skladištenja (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Kurtanjek Ž, Elez Garofulić I (2014) Kinetics of the Degradation of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols During Heat Treatments of Freeze-Dried Sour Cherry Marasca Paste. *Food Technol Biotechnol* **52**, 101-108.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Kolanović

Vlastoručni potpis