

# Optimiranje proizvodnje praha ulja pulpe pasjeg trna primjenom sušenja raspršivanjem

---

**Dragičević, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:159:706086>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Marina Dragičević

**OPTIMIRANJE PROIZVODNJE  
PRAHA ULJA PULPE PASJEG  
TRNA PRIMJENOM SUŠENJA  
RASPRŠIVANJEM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Sandre Pedisić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Patricije Čuline, mag. ing. techn. aliment.

**Ovo istraživanje financirano je sredstvima 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 je prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

## OPTIMIRANJE PROIZVODNJE PRAHA ULJA PULPE PASJEG TRNA PRIMJENOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Marina Dragičević, univ. bacc. nutr.  
0058208999

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je primjenom sušenja raspršivanjem proizvesti prah ulja pulpe pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) te utvrditi utjecaj temperature (120-180 °C) te omjera ulja i nosača (1:2-1:4) na stabilnost  $\alpha$ -tokoferola, ukupnih karotenoida te antioksidacijski kapacitet (AOK). Visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) određeni su  $\alpha$ -tokoferol i ukupni karotenoidi, dok je ORAC metodom određen AOK. U odnosu na početno ulje u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola bilo je u rasponu od 34,75 do 45,33 %, karotenoida od 8,20 do 47,13 % te AOK od 48,73 do 95,61 %. Rezultati statističke analize pokazali su da je temperatura sušenja značajno utjecala na vrijednosti karotenoida i AOK te da je omjer ulja i nosača značajno utjecao na vrijednosti tokoferola, karotenoida i AOK. Optimalni uvjeti za proizvodnju praha s visokim masenim udjelima  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te visokim vrijednostima AOK određeni su pri temperaturi sušenja od 120 °C i omjeru ulja i nosača 1:2.

**Ključne riječi:** *ulje pulpe pasjeg trna, sušenje raspršivanjem, karotenoidi,  $\alpha$ -tokoferol, antioksidacijski kapacitet*

**Rad sadrži:** 56 stranica, 10 slika, 4 tablica, 121 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Sandra Pedisić

**Pomoć pri izradi:** Patricija Čulina, mag. ing. techn. aliment.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. Doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. Doc. dr. sc. Zoran Zorić (član)
4. Prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 22. prosinca 2021.

## 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: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

### OPTIMIZATION OF SEA BUCKTHORN PULP OIL POWDER PRODUCTION BY SPRAY DRYING

*Marina Dragičević*, univ. bacc. nutr.  
0058208999

**Abstract:** The aim of this study was to produce sea buckthorn pulp oil (*Hippophae rhamnoides* L.) powder by spray drying and to evaluate the influence of temperature (120-180 °C) and oil to wall ratio (1:2-1:4) on the stability of  $\alpha$ -tocopherol and total carotenoid content and antioxidant capacity (AOC) using gum arabic as wall material. The  $\alpha$ -tocopherol and total carotenoid content were determined by the HPLC method, while AOC was determined by the ORAC method, respectively. Compared to the initial oil, retention of  $\alpha$ -tocopherol ranged from 34.75 to 45.33 %, total carotenoid from 8.20 to 47.13 % and AOC from 48.70 to 95.61 %. Statistical analysis showed that drying temperature significantly affected the carotenoid content and AOC and that the oil to wall ratio significantly affected the  $\alpha$ -tocopherol and carotenoid content and AOC. The optimal conditions were determined at drying temperature of 120 °C and oil to wall ratio of 1:2.

**Keywords:** *sea buckthorn pulp oil, spray drying,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids, antioxidant capacity*

**Thesis contains:** 56 pages, 10 figures, 4 tables, 121 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:** PhD, Sandra Pedisić, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Patricija Čulina, PhD Research Assistant

#### Reviewers:

1. PhD. Ivona Elez Garofulić, Assistant professor (president)
2. PhD. Sandra Pedisić, Assistant professor (mentor)
3. PhD. Zoran Zorić, Assistant professor (member)
4. PhD. Sandra Balbino, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 22nd December 2021

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. PASJI TRN ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) .....  | 2         |
| 2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke .....  | 2         |
| 2.1.2. Biološki aktivni spojevi.....  | 4         |
| 2.1.2.1. Karotenoidi .....  | 4         |
| 2.1.2.2. Tokoferoli .....   | 6         |
| 2.1.3. Ulje pasjeg trna.....  | 7         |
| 2.2. EKSTRAKCIJA ULJA.....  | 8         |
| 2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. <i>Ultrasound assisted extraction – UAE</i> ) .....   | 9         |
| 2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim CO <sub>2</sub> .....   | 10        |
| 2.2.3. Potencijalna upotreba ulja pasjeg trna i utjecaj na zdravlje .....   | 10        |
| 2.3. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM BILJNIH EKSTRAKATA I ULJA PASJEG TRNA .....  | 11        |
| 2.3.1. Utjecaj uvjeta sušenja raspršivanjem na stabilnost biološki aktivnih spojeva ...   | 13        |
| 2.3.2. Primjena prahova u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji .....   | 16        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>18</b> |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 18        |
| 3.1.1. Uzorak ulja pulpe pasjeg trna.....   | 18        |
| 3.1.2. Kemikalije .....   | 18        |
| 3.1.3. Aparatura i pribor .....   | 20        |
| 3.2. METODE RADA .....  | 21        |
| 3.2.1. Priprema uzorka za sušenje raspršivanjem.....  | 21        |
| 3.2.2. Proizvodnja praha iz ulja pulpe pasjeg trna primjenom sušenja raspršivanjem.   | 22        |
| 3.2.3. Ekstrakcija tokoferola i karotenoida iz praha ulja pulpe pasjeg trna potpomognuta ultrazvukom .....  | 24        |
| 3.2.4. Određivanje tokoferola HPLC metodom uz fluorescentni detektor (FLD) .....  | 25        |
| 3.2.5. Određivanje karotenoida HPLC metodom uz PDA detektor .....   | 27        |
| 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom.....  | 30        |
| 3.2.7. Izračun zadržavanja $\alpha$ -tokoferola i karotenoida te vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (L-ORAC) u odnosu na početno ulje ..... | 32        |
| 3.2.8. Obrada rezultata .....   | 32        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>33</b> |
| 4.1. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA MASENI UDIO $\alpha$ -TOKOFEROLA U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA .....                                      | 36        |
| 4.2. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA MASENI UDIO KAROTENOIDA U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA .....   | 38        |



|   |           |
|---|-----------|
| 4.3. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA..... | 40        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE .....</b>  | <b>43</b> |

# 1. UVOD

Današnji ubrzani način života, razvoj tehnologije, nedostatak vremena i učestalost mnogih bolesti, nagnali su suvremenog čovjeka da sve više osvijesti važnost pravilne prehrane. Veliku zabrinutost izazivaju sintetički proizvedeni dodaci u prehrambenim proizvodima što je potaknulo razvoj različitih tehnologija u svrhu očuvanja biološki aktivnih spojeva ponajviše iz biljaka, ali i drugih prirodnih izvora koji se koriste u prehrambenoj industriji zbog svojih organoleptičkih svojstava, bioloških aktivnosti te pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi.

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) je listopadni grm iz obitelji zlolesina (Elaeagnaceae), široko rasprostranjen u umjerenom pojasu Azije i Europe. Vrlo je cijenjen zbog svog visokog nutritivnog i ljekovitog potencijala iz razloga što gotovo svi dijelovi ove biljke, uključujući plod, sjemenke, lišće i koru, sadrže raznolik izvor hidrofilnih i lipofilnih biološki aktivnih spojeva. Iz ploda pasjeg trna može se dobiti ulje pulpe. Jedno je od ulja koje sadrži omega-3, omega-6, omega-7 i omega-9 masne kiseline. Također je bogato karotenoidima, flavonoidima, fitosterolima, tokoferolima te esencijalnim aminokiselinama. Ovi spojevi su relativno nestabilni te je važno poboljšati njihovu stabilnost tijekom procesiranja i skladištenja ulja.

Jedan od načina očuvanja biološki aktivnih spojeva ulja je inkapsulacija, kojom se tekući uzorak prevodi u čvrsto stanje. Najčešće primjenjivana tehnika inkapsulacije je sušenje raspršivanjem koja se sastoji od raspršivanja tekućeg uzorka, uz primjenu nosača u struji vrućeg zraka pri čemu nastaje prah. Sušenje raspršivanjem je popularna metoda inkapsulacije koja se najčešće primjenjuje zbog svoje praktičnosti, niske cijene te konačnog proizvoda visoke kvalitete sa poželjnim fizikalno-kemijskim svojstvima uz najveću stabilnost biološki aktivnih spojeva. Kako bi se uspješno provelo sušenje raspršivanje, potrebno je uzeti u obzir specifičnosti ispitivanog uzorka, te optimizirati vrstu nosača i uvjete samog procesa sušenja raspršivanjem.

Cilj ovog istraživanja bio je primjenom sušenja raspršivanjem proizvesti prah ulja pulpe pasjeg trna te utvrditi utjecaj temperature (120, 150 i 180 °C) te omjera ulja i nosača (1:2, 1:3 i 1:4) na stabilnost karotenoida, tokoferola te na antioksidacijski kapacitet.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides* L.)

#### 2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) je višegodišnja listopadna biljka koja raste u obliku razgranatog grma 2-3 m visine ili kao drvo do 6 m visine, iz roda *Hippophae*, obitelji *Eleagnaceae* (Suryakumar i Gupta, 2011; Khan i sur., 2010). Smatra se autohtonom sortom Kine otkuda se dalje proširio po Aziji, Europi i Kanadi (Davidson i sur., 1994). Pasji trn (slika 1) raste najčešće na sunčanim dijelovima planina, u riječnim dolinama te priobalnim područjima gdje je pretežno pjeskovito i vapneno tlo, kao male izolirane jedinke ili u simbiozi s drugim biljnim vrstama u šumi ili šikari. Mnoga istraživanja pokazala su da je biljka izuzetno otporna na veliki temperaturni raspon od (-) 43 do (+) 45 °C i sušu, iako većina prirodno raste u područjima na kojima godišnje padne 400-600 mm oborina te može preživjeti na jako slanom tlu. U Rusiji uzgajaju se pretežno na nadmorskim visinama od 1200 do 2000 m, dok na visini od 3900 m biljka ne daje plodove (Li, 2003). Suprotno tomu, u Tibetu raste na nadmorskoj visini od 3300 do 4500 m (Guliyev i sur., 2004). U Republici Hrvatskoj raste uz pjeskovite i šljunkovite obale rijeka u sjevernim područjima države, a ponajviše uz obale rijeka Drave i Dunava. Rjeđe se pojavljuje u kamenitim obroncima planinskih krajeva (preko 1000 m nadmorske visine) ili uz morsku obalu. Narodna imena pasjeg trna su vučji trn, vukodržica i zlolesina (Grljić, 1990).



**Slika 1.** Prikaz: listova, trnja i plodova pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) (Pundir, 2020)

Prema povijesnim izvorima prvi zapisi o ljekovitim svojstvima pasjeg trna pojavljuju se u 4. st. pr. Kr. (Zakynthinos i Varzakas, 2015). Kemijski sastav pojedinih dijelova biljke razlikuju se ovisno o porijeklu, klimatskim uvjetima, vrsti tla, području gdje biljka raste te metodi ekstrakcije (Zeb, 2006). Prema literaturnim podacima u svim dijelovima biljke određeno je preko 200 biološki aktivnih spojeva poput polifenola, flavonoida, karotenoida, tokoferola, masnih i organskih kiselina, amino kiselina, šećernih alkohola, tanina, vitamina i raznih drugih spojeva (Kumar i sur., 2011). Polifenolni spojevi (klorogenska kiselina, flavanoli, procijanidini, katehini) i flavonoli (kvercetin, kampferol, miricetin, izoramnetin) određeni su u svim dijelovima biljke pasjeg trna (Pundir i sur., 2020). U značajnim udjelima određeni su katehin, galokatehin i epigalokatehin u alkoholnim ekstraktima grana, a tanini u ekstraktima korijena (16-42 mg CE g<sup>-1</sup> suhe tvari) i stabljike (14-34 mg CE g<sup>-1</sup> suhe tvari).

Neka su istraživanja pokazala jako dobar sastav polifenola ekstrahiranih iz stabljike (52-95 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari) i korijena (36-139 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari) biljke pasjeg trna. Sastav ostalih bioloških aktivnih spojeva u korijenu, stabljici i granama nije još dovoljno istražen (Jastrzab i Skrzydlewska, 2019).

List pasjeg trna je bogat izvor mineralnih tvari (magnezija, kalcija, kalija) i organskih kiselina (oleinska, miristinska, palmitinska). U istraživanju Yue i sur. (2017) u listu pasjeg trna maseni udio ukupnih fenola određen je u rasponu od 76,07 do 93,72 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari, a flavonoida od 47,06 do 66,40 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari. U svom radu Khan i sur. (2010) utvrdili su da maseni udio flavonoida u suhom lišću pasjeg trna iznosi 3888 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> dok plod sadrži 854 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Svježi listovi su bogat izvor klorofila (98,8 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) čija je vrijednost slična klorofilu iz svježe lisnatog zelenog povrća (Guan i sur., 2006).

Plod pasjeg trna je jedan od najbogatijih izvora nutrijenata u biljnom svijetu, a sastoji se od sjemenke (23 %), pulpe (68 %) i pokožice (8 %). Kemijski sastav ploda pasjeg trna ovisi o klimi, sorti, veličini ploda, načinima obrade te zrelosti ploda (Leskinen i sur., 2009). Iz ploda može se dobiti sok pulpe i ulje sjemenke ili pulpe ploda (Beveridge i sur., 1999). Ugljikohidrati su glavna komponenta suhe tvari čiji udio varira između 400-600 g kg<sup>-1</sup> suhe tvari. Najzastupljeniji polisaharidi su celuloza, hemiceluloza, pektin i hidrokoloide koji zajedno s ligninom tvore dijetalna vlakna. Glukoza, fruktoza i šećerni alkoholi (ksiloza, manitol, sorbitol) značajni su monosaharidi (27-58 g kg<sup>-1</sup> suhe tvari) zrelih plodova. U usporedbi s drugim bobičastim voćem plod pasjeg trna karakterizira visok sadržaj proteina te slobodnih esencijalnih aminokiselina. Tako na primjer, u plodovima uzgojenim u Indiji

sadržaj proteina iznosio je 46-129 g kg<sup>-1</sup> suhe tvari, a u plodovima uzgojenim u Poljskoj 93 g kg<sup>-1</sup> suhe tvari ploda. Udio ulja u sjemenkama ploda iznosio je oko 100-160 g kg<sup>-1</sup> svježeg ploda, u pulpi i pokožici ploda oko 20-205 g kg<sup>-1</sup> svježeg ploda (Ciesarová i sur., 2020). U soku pulpe pasjeg trna prisutan je veliki broj mineralnih tvari (kalij, magnezij, kadmij, cink, bakar, željezo) i organskih kiselina (kina, jabučna, vinska, oksalna). Od bioloških aktivnih spojeva osim fenolnih spojeva prisutni su još karotenoidi, ursolna kiselina, 5-hidroksimetil-2-furaldehid i razni drugi spojevi (Pundir i sur., 2020).

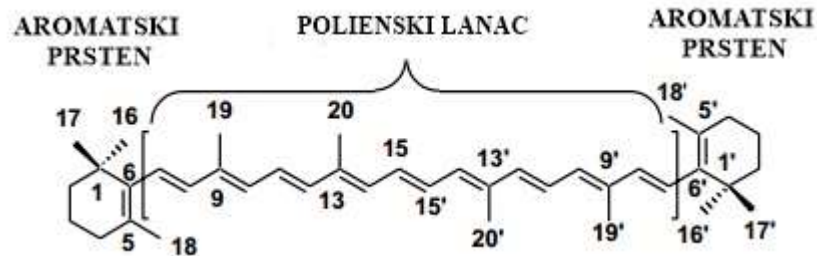
### 2.1.2. Biološki aktivni spojevi

Biološki aktivni spojevi prisutni u hrani imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. U takvu skupinu spojeva ubrajaju se omega-3 masne kiseline, probiotici, prebiotici, karotenoidi, fenolni spojevi, tokoferoli, esencijalne mineralne tvari, bioaktivni proteini, peptidi i aminokiseline. Zbog svojih različitih bioloških djelovanja kao naprimjer antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja, imaju sve veću primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Koncentrirani izvori bioaktivnih spojeva dobivaju se izolacijom iz hrane, a zatim se pročišćavaju, suše i dodaju u sastav funkcionalne hrane, dodataka prehrani ili biljnih lijekova (Arpagaus, 2019).

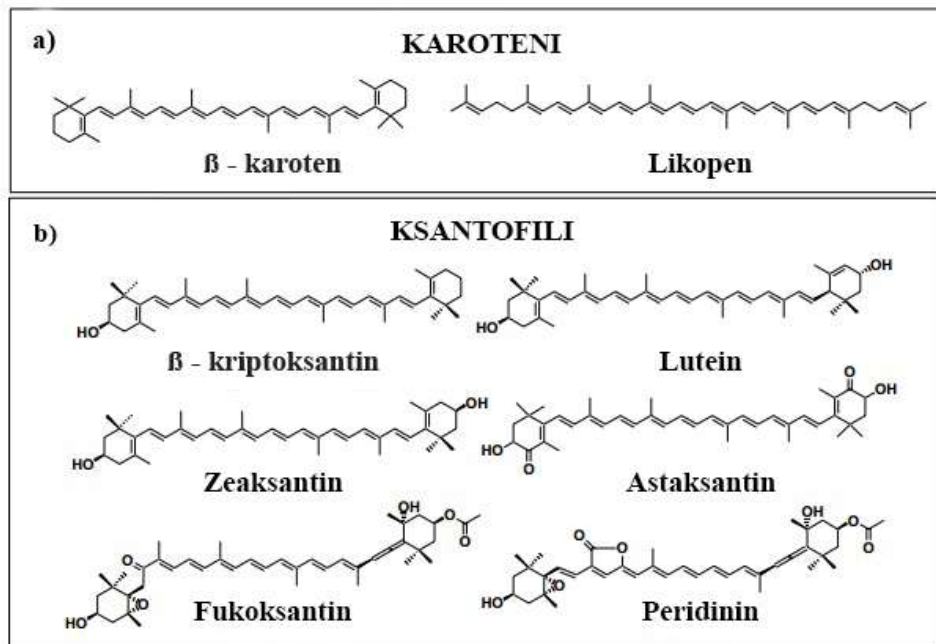
#### 2.1.2.1. Karotenoidi

Karotenoidi su lipofilni pigmenti koje sintetiziraju biljke, gljive, alge i bakterije. Ljudi i životinje ne mogu ih sintetizirati, nego ih unose prehranom. Po kemijskom sastavu su tetraterpeni, odnosno derivati izoprena izgrađeni od 8 izoprenskih jedinica smještenih simetrično u odnosu na centar molekule. Poliizoprenska struktura sadrži konjugirane dvostruke veze te alifatski ili aromatski prsten na jednom ili oba kraja polienskog lanca (slika 2). Dvostruke veze odgovorne su za žutu, rozu, narančastu i crvenu boju kod lišća biljaka, voća, povrća te kod nekih ptica, riba i rakova (Elvira-Torales i sur., 2019; Rodriguez-Concepcion i sur., 2018). Karotenoidi se dijele u 2 skupine (slika 3): karotene (likopen,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten) i ksantofile (lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, kapsantin). Karoteni sadrže samo ugljik i vodik, dok ksantofili imaju vezan jedan ili više atoma kisika u obliku hidroksilne, karboksilne, keto ili aldehidne skupine. Dijele se još na one koji imaju i nemaju provitaminsku aktivnost. Karotenoidi koji su prekursori vitamina A ( $\beta$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin) imaju barem jedan  $\beta$ -jononski prsten na kraju polienskog lanca od barem 11 ugljikovih atoma (Mezzomo i Ferreira, 2016). U biljkama su dio fotosintetskog sustava zajedno s klorofilima te ih štite od fotooksidacijskog oštećenja i sudjeluju u proizvodnji

biljnih hormona (Elvira-Torales i sur., 2019). Zajedno s tokolima i polifenolima imaju antioksidacijski učinak u uljima. Bitan su aspekt ljudske prehrane i zdravlja zbog svoje provitaminske i antioksidacijske aktivnosti kod kožnih, očnih, onkoloških te kardiovaskularnih bolesti (Konuskan, 2020).



**Slika 2.** Osnovna struktura karotenoida na primjeru  $\beta$ -karotena (prema Maoka, 2020)



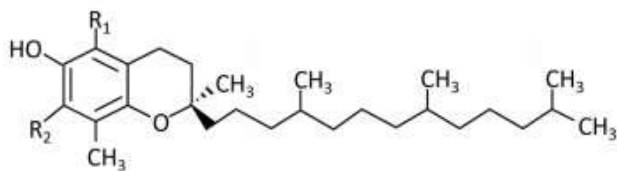
**Slika 3.** Kemijske strukture: a) karotena, b) ksantofila (prema Maoka, 2020)

Poznato je da su plodovi pasjeg trna bogati karotenoidima i njihovim esterima te da ukupna količina i prisutnost različitih vrsta karotenoida ovisi o porijeklu, uvjetima uzgoja, klimatskim uvjetima i vremenu berbe (Andersson i sur., 2009). Maseni udio karotenoida u plodovima pasjeg trna ( $11 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  svježeg ploda) sličan je u usporedbi s drugim biljnim vrstama bogatim karotenoidima poput rajčice ( $13 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  svježeg ploda) i mrkve ( $9 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  svježeg ploda) (Olas i sur., 2018). Identificirano je oko 41 karotenoida u različitim sortama pasjeg trna. Najzastupljeniji karotenoid u plodovima pasjeg trna je  $\beta$ -karoten (15-55

%), dok su ostali karotenoidi poput likopena,  $\alpha$ -karoten, dihidroksi- $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, zeaksantina, luteina,  $\beta$ -kriptoksantin i kantaksantin određeni u nižim udjelima (Olas i sur., 2018; Andersson i sur., 2009). U istraživanju Pop i sur. (2014) analiziran je sastav karotenoida plodova i lišća u 6 različitih sorti pasjeg trna uzgojenih na Karpatima. U plodovima su karotenoidi određeni u većim masenim udjelima ( $53-97 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari) nego u lišću ( $3,5-4,2 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari), a najzastupljeniji bili su  $\beta$ -karoten ( $1,9-7,4 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari), likopen ( $1,4-2,3 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari),  $\beta$ -kriptoksantin ( $1,3-1,6 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari) te zeaksantin ( $1,8-2,5 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$  suhe tvari). U drugom istraživanju ukupan prosječan maseni udio karotenoida ploda pasjeg trna sorte Mara iz Rumunjske iznosio je  $172 \text{ mg kg}^{-1}$  svježeg ploda odnosno  $840 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari ploda. Najzastupljeniji karotenoidi u sorti Mara bili su zeaksantin, zeaksantin dipalmitat i drugi njegovi esteri te  $\beta$ -karoten, likopen i  $\beta$ -kriptoksantin palmitat (Pop i sur., 2015). Za razliku od ulja sjemenke, ulje pulpe pasjeg trna sadrži visok udio karotenoida ( $692-3420 \text{ mg kg}^{-1}$  pulpe svježih plodova) (Ranjith i sur., 2006). U ulju pasjeg trna određeno je 18 različitih karotenoida, poput  $\beta$ -karotena,  $\gamma$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina i sinteksantina, koji posjeduju provitaminsku aktivnost (Li i sur., 2003).

#### 2.1.2.2. *Tokoferoli*

Tokoferoli su lipofilni antioksidansi koji zajedno sa tokotrienolima pripadaju zajedničkoj grupi spojeva pod općim nazivom vitamin E. Građeni su od kromanolske okosnice s jednom do tri metilne skupine (na C-5, C-7, C-8) aromatskog prstena te zasićenim izoprenoidnim lancem (Ozcan i sur., 2019; Lachman i sur., 2018). Pojavljuju se u prirodi u 4 različita kemijska izomera:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol (slika 4). Najveću vitaminsku aktivnost pokazuje  $\alpha$ -tokoferol, dok  $\gamma$ -tokoferol pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost. Imaju važnu antioksidacijsku ulogu kod stabilnosti ulja, uklanjanja slobodnih radikala i singletnog kisika te lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina (Konuskan, 2020). Glavni su antioksidansi topivi u lipidima u ljudskoj plazmi te imaju važnu ulogu kod obrane organizma od oksidativnog stresa (Ranard i sur., 2019). Udio tokoferola u plodovima ovisi o porijeklu, sorti, vremenu berbe i sazrijevanju, dok u pojedinim uljima ovisi o sorti, metodi ekstrakcije i pročišćavanja (Chun i sur., 2006).



| Naziv | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |
|-------|-----------------|-----------------|
| α-    | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| β-    | CH <sub>3</sub> | H               |
| γ-    | H               | CH <sub>3</sub> |
| δ-    | H               | H               |

**Slika 4.** Kemijska struktura α-, β-, γ- i δ-tokoferola (prema Niki i Abe, 2019)

Maseni udio ukupnih tokoferola u plodovima sorti *H. rhamnoides spp. sinensis* i *H. rhamnoides spp. mongolica* iznosio je 56-140 mg kg<sup>-1</sup>, odnosno 1,5-8,1 mg kg<sup>-1</sup> ploda. U najvećem udjelu određen je α-tokoferol (76-89 %), dok su β-, γ- i δ-tokoferol određeni u znatno manjem udjelu (Kallio i sur., 2002). U istraživanju Zielinski i sur. (2017) maseni udio tokoferola u plodovima pasjeg trna iznosio je 110-160 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> plodova. U usporedbi s drugim biljnim vrstama kao na primjer rajčica, špinat, kupina i malina (35-50 mg kg<sup>-1</sup>), plodovi pasjeg trna izrazito su bogati tokoferolima, pogotovo α-tokoferolom. Bolji izvor α-tokoferola imaju sjemenke suncokreta (350 mg kg<sup>-1</sup>), badema (250 mg kg<sup>-1</sup>) i lješnjaka (150 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na plod pasjeg trna (Chun i sur., 2006). Prema literaturnim podacima ulje pulpe bez sjemenke je bolji izvor α-tokoferola, nego ulje dobiveno iz sjemenki. Ulje dobiveno iz pulpe nakon uklanjanja soka i sjemenki (481 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> ploda) imalo je veći udio tokoferola od ulja iz soka (216 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> voća) te ulja sjemenki (64-93 mg 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> sjemenke) pasjeg trna (Li i sur., 2003). U istraživanju Cenkowski i sur. (2006) određen je veći udio α-, γ- i δ-tokoferola u ulju sjemenki u odnosu na ulje pulpe pasjeg trna te podjednak udio β-tokoferola u oba ulja. Razlog tomu je različita vrsta ekstrakcije (ekstrakcija otapalom - petroleum eterom, superkritičnim CO<sub>2</sub>, vretenasto prešanje i vodena ekstrakcija) tokoferola. Veći udio α-tokoferola ima ulje pulpe (444-1550 mg kg<sup>-1</sup>) i ulje sjemenki (630-1940 mg kg<sup>-1</sup>) u usporedbi s drugim biljnim uljima poput maslinovog (98-370 mg kg<sup>-1</sup>), suncokretovog (432 mg kg<sup>-1</sup>) te kukuruznog (173 mg kg<sup>-1</sup>) (Ranard i sur., 2019).

### 2.1.3. Ulje pasjeg trna

Ulje pasjeg trna može se proizvesti od svih dijelova ploda, odnosno zrele sjemenke (8-20 %), osušene pulpe (20-25 %) i ostataka nakon prešanja ploda za sok (15-20 %). Ulja pulpe i sjemenke bogata su vitaminima A, C, E, K i B skupine, tokoferolima (α-tokoferol), tokotrienolima i karotenoidima (likopen i β-karotene) (Teleszko i sur., 2015). Ulja pasjeg trna dobar su izvor omega-3 (linolenska), omega-6 (linolna), omega-7 (palmitoleinska) i omega-9 (palmitinska) masnih kiselina te se najviše razlikuju u njihovom sastavu (Pundir i sur., 2020; Kumar i sur., 2011). Ulje sjemenke bogato je omega-3 (linolenska) i omega-6 (linolne)



masnim kiselinama, dok u ulju pulpe prevladaju omega-7 (palmitoleinska) masne kiseline te se najčešće pojavljuju zajedno s bioaktivnim spojevima poput karotenoida, fitosterola i tokoferola (Teleszko i sur., 2015). Jedino prirodno ulje u kojem je omjer omega-3 i omega-6 masne kiseline 1:1 je ulje sjemenke pasjeg trna (Pundir i sur., 2020). Sastav masnih kiselina može varirati ovisno o podvrsti, vremenu berbe i načinu ekstrakcije (Yang i Kallio, 2002). Fitosteroli su glavne komponente nesaponificiranih ulja, a najzastupljeniji su  $\beta$ -sitosterol i 5-avenasterol. Ostali fitosteroli, poput kolesterola, kampesterola i stigmasterola, prisutni su u malim udjelima (Li i sur., 2003). Ulje sjemenke pasjeg trna je dobar izvor mineralnih tvari poput sumpora, selena, cinka i bakra (Zielińska i Nowak, 2017).

## **2.2. EKSTRAKCIJA ULJA**

Ekstrakcija je postupak kojim se izdvajaju bioaktivni spojevi iz homogenih smjesa inertnih biljnih tkiva na temelju različite topljivosti u različitim otapalima. Topljivi biljni materijal koristi se za daljnje analize, dok se netopljive balastne tvari uklanjaju (Handa, 2008). Učinkovitost ekstrakcije ovisi o raznim parametrima poput vrste i podrijetla biljnog uzorka, vrste otapala, temperature, omjeru uzorka i otapala te vremenu ekstrakcije (Abubakar i Haque, 2020). Izbor otapala ovisi o vrsti i prirodni biljke iz koje se trebaju ekstrahirati biološki aktivni spojevi. Otapala se dijele na polarna (voda, metanol, etanol) i nepolarna (heksan, diklormetan, kloroform) (Sasidharan i sur., 2011).

Postoje konvencionalne i napredne metode ekstrakcije, ali se niti jedna metoda ne smatra standardnom za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljaka (Abubakar i Haque, 2020). U konvencionalne metode ekstrakcije ubrajaju se mehanička ekstrakcija, ekstrakcija otapalom, hidrodestilacija, destilacija vodenom parom, ekstrakcija vrućom vodom te Soxhlet ekstrakcija (El Asbahani i sur., 2015). Kod konvencionalnih metoda ekstrakcije koriste se organska otapala poput n-heksana, heksana, petroleum etera, etil acetata, acetona i kloroforma. Najčešće se koriste heksan i n-heksan zato što daju najveći prinos (95 %) (Tan i sur., 2016). Upotreba heksanskih otapala pokazala su visoku učinkovitost ekstrakcije, međutim njihova upotreba je štetna i toksična za zdravlje ljudi te dovodi do zagađenja okoliša (Konopka i sur., 2016). Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije su velika potrošnja organskih otapala i energije zbog izrazito dugog vremena ekstrakcije odnosno intenzivnog zagrijavanja i/ili miješanja tijekom ekstrakcije. Tijekom vremena razvile su se i napredne odnosno zelene metode poput ekstrakcije hladnim prešanjem, subkritičnih (SWE) i

superkritičnih fluida (SFE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), slobodnim mikrovalovima (MAE), visokotlačna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim poljem te ekstrakcija uz pomoć enzima (Ramadan, 2020; Mwaurah i sur., 2019). Naprednim metodama ekstrakcije skratilo se vrijeme ekstrakcije i smanjila potrošnja otapala koja rezultira očuvanjem termolabilnih spojeva čime se poboljšala kvaliteta ekstrahiranih spojeva, viši je prinos ekstrakata te su napredne metode ekstrakcije ekološki prihvatljive. Umjesto heksana kod naprednih metoda ekstrakcije kao otapala koriste se voda, etanol, ugljični dioksid i ionske tekućine (Chemat i sur., 2017).

Ekstrakcijom se mogu proizvesti biljni ekstrakti i ulja ovisno o sirovini, odnosno biljnoj vrsti. Biljna ulja sastoje se od nepolarnih i lipofilnih spojeva čiji je sastav vrlo promjenjiv i složen, a ovisi o porijeklu te kvaliteti i metodama proizvodnje (Yara-Varón i sur., 2017). Ulja se mogu ekstrahirati konvencionalnim i naprednim metodama ekstrakcije. Od iznimne je važnosti odabrati adekvatnu metodu ekstrakcije ulja radi kvalitete konačnog proizvoda te mogućeg utjecaja na okoliš (Tiwari, 2015). Ulja se najčešće proizvode konvencionalnim metodama poput prešanja i/ili ekstrakcijom otapala iz sjemenke ili ploda biljke. Zbog sve veće potražnje za bioaktivnim lipidnim spojevima, sve se više koriste napredne metode ekstrakcije koje se primjenjuju u industriji proizvodnje ulja kako bi se minimizirale negativne promjene u nutritivnoj kvaliteti te fizikalno-kemijskim i organoleptičkim svojstvima ulja. Paralelno smanjuje se utjecaj ugljikovog otiska otapala (Ramadan, 2020).

#### 2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasound assisted extraction – UAE*)

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound assisted extraction – UAE*) je učinkoviti način ekstrakcije ulja i bioloških aktivnih spojeva osjetljivih na toplinu iz biljnog tkiva (Chemat i sur., 2004). Cilj je povećanje prinosa ekstrahiranog spoja, povećanje stope ekstrakcije, postizanje smanjenja vremena procesiranja te veće propusnosti. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, vremenu tretiranja i polarnosti medija, koji može biti čista otopina ili smjesa otapala. Prilikom prolaska ultrazvučnih valova kroz medij, dolazi do nastajanja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, odnosno fluktacije tlaka, što rezultira pojavom kavitacije (Drmić i Režek Jambrak, 2010), koja uzrokuje mikro oštećenja staničnih stijenki čime se postiže poboljšan

prijenos mase i bolji pristup otapala staničnom sadržaju procesima difuzije i osmoze. (Drmić i Jambrak, 2010; Vinatoru, 2001).

### 2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub>

Ekstrakcija superkritičnim fluidom je napredna metoda ekstrakcije u kojoj se kao otapalo koristi superkritični fluid koji nastaje kada se temperatura i tlak fluida podignu iznad njegove kritične točke. U tom stanju fluid ima svojstva tekućine i plina. Idealnim otapalom za ekstrakciju superkritičnim fluidima smatra se CO<sub>2</sub> zbog svoje niske kritične temperature (31 °C) i niskog kritičnog tlaka (74 bara). Ostala svojstva i prednosti CO<sub>2</sub> kao superkritičnog fluida da je po kemijskoj strukturi čisto, nepolarno te stabilno i ekološki prihvatljivo otapalo bez boje, mirisa i okusa. Karakterizira ga nisko svojstvo viskoziteta, visoki koeficijent difuzije te mala površinska napetost fluidnog otapala koja dovodi do boljeg prodiranja u unutrašnjosti uzorka što za posljedicu ima bolji prijenos mase. Pomoću njega ekstrahiraju se termolabilni spojevi na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije lako se uklanja iz uzoraka i ne zaostaje poput organskih otapala te ga je moguće ponovno upotrijebiti kao otapalo (Nde i Foncha, 2020; Selvamuthukumar i Shi, 2017; Mandal i sur., 2015). Glavni nedostatak CO<sub>2</sub> je niska polarnost što ga čini idealnim otapalom za lipidne, masne i nepolarne tvari, ali neprikladnim za polarne uzorke. Zbog toga upotrebljavaju se modifikatori ili suotapala, poput metanola, etanola, tetrahidrofurana, kloroforma, koji se dodaju u tekućem obliku u ekstraktor ili direktno superkritičnom CO<sub>2</sub> kako bi se namjestila potrebna polarnost za učinkovitu ekstrakciju (Mandal i sur., 2015).

### 2.2.3. Potencijalna upotreba ulja pasjeg trna i utjecaj na zdravlje

Povećan je interes za upotrebu ulja pasjeg trna kao funkcionalnog prehrambenog proizvoda zbog prisutnosti visoko hranjivih i ljekovitih spojeva koje sadrži (Ding i sur., 2016). Ulje je sastojak u kapsulama na bazi bilja, u želatini i tekućinama za oralnu upotrebu (Yang i Kallio, 2002). U Kini i Rusiji ulje pasjeg trna je odobreno za kliničku upotrebu kao dodatak prehrani zbog modulatornog djelovanja na različita klinička stanja. Također, komercijalno je dostupan u kozmetičkim proizvodima kao krema ili šampon te se koristi u farmaceutskoj industriji za proizvode koji imaju protuupalno i antimikrobno djelovanje, za ublažavanje boli i obnovu tkiva (Olas, 2018).

Palmitoleinska kiselina iz ulja pulpe pasjeg trna ima povoljne učinke na epitelna tkiva probavnog, respiratornog i urološkog sustava te vaginalnu sluznicu i unutrašnjosti oka.

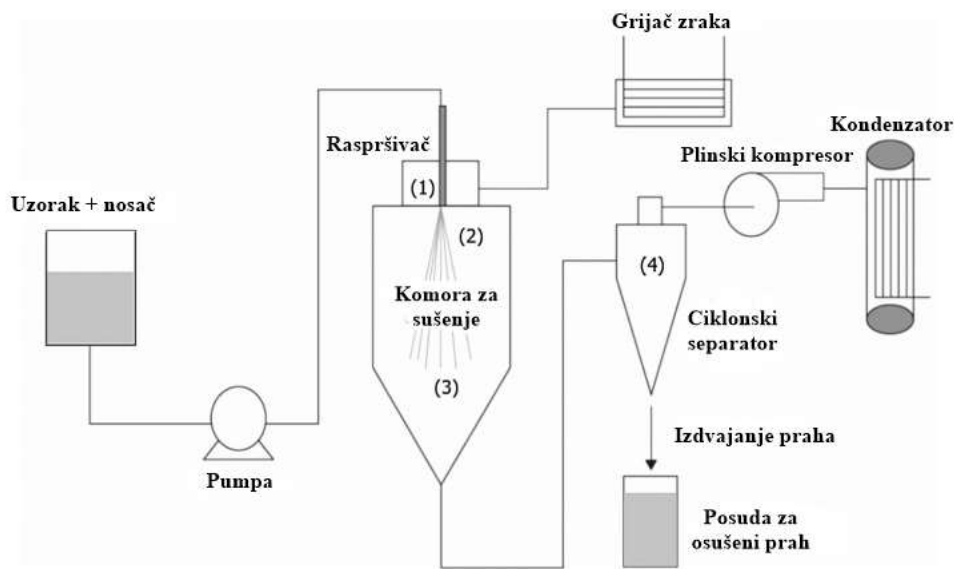
Primjenom ulja sprječava se i liječi lezija sluznice želuca kod gastritisa, čira na želucu te erozija maternice i upale genitalnih organa (Jastrzab i Skrzydlewska, 2019; Marsiñach i Cuenca, 2019). Istraživanja su pokazala da se suplementacijom ulja pasjeg trna prevenirala ateroskleroza zbog inhibitornog učinka na nakupljanje plaka na krvnim žilama te se kod osoba s kardiovaskularnim bolestima znatno smanjio ukupni kolesterol, LDL-kolesterol i trigliceridi, a povećao HDL-kolesterol. Uz to ulje sjemenke pasjeg trna ima blagotvorni učinak na smanjenje krvnog tlaka kod hipertenzije. Razlog svemu tome su razni bioaktivni spojevi poput flavonoida,  $\beta$ -sitosterola, omega-3, omega-6 i omega-9 masnih kiselina prisutnih u ulju te visok sadržaj antioksidanasa poput vitamina E i karotenoida iz ulja (Rafalska i sur., 2017; Vashishtha i sur., 2017). Ekstrakti ulja pasjeg trna koriste se u liječenju kožnih bolesti poput ekcema, psorijaze, eritemskog lupusa i atopijskog dermatitisa te sudjeluju u procesu zacjeljivanja rana poput opekline, ozeblina, dekubitusa i oštećenja na koži nastalim izlaganjem suncu ili x-zrakama (Zielińska i Nowak, 2017; Khan i sur., 2010). Kod malignih bolesti ima važnu ulogu kod liječenja kemoterapijom i radioterapijom. Primjena ulja pasjeg trna povezana je s poboljšanjem apetita, obnovom funkcije bubrega i jetre te održavanjem dobrog zdravlja pacijenta (Olas, 2018). Ulje se rabi u kozmetičkim proizvodima protiv starenja kože te proizvodima za učvršćivanje i toniranje bora, smanjuje suhoću i promjenu boje kože, kao umirujuće sredstvo nakon pilinga ili depilacije (Rafalska i sur., 2017).

### **2.3. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM BILJNIH EKSTRAKATA I ULJA PASJEG TRNA**

Sušenje je proces uklanjanja vode i vlage iz namirnica s ciljem očuvanja prirodnih i nutritivno vrijednih sastojaka hrane, sprječavanja mikrobioloških i kemijskih promjena, povećanja produktivnosti procesa te bolje kontrole procesa kako bi se postigla bolja kvaliteta proizvoda. Tehnike sušenja dijele se na prirodno sušenje na suncu prilikom kojeg se namirnica suši prirodnim strujanjem zraka te na tehnike sušenja pod kontroliranim uvjetima gdje pripadaju metode sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, sušenje u fluidiziranom sloju, vakuum sušenje te sušenje osmozom (Phisut, 2012). Izbor adekvatne metode ovisi o fizikalno-kemijskom sastavu, termostabilnosti te namjeni proizvoda (Cortés-Rojas i Oliveira, 2012).

Sušenje raspršivanjem je alternativna metoda sušenja kojom se tekući ili polutekući pripravci prevode u prah određenih svojstava poput sadržaja vlage, veličine i morfologije

čestica, topljivosti, nasipne gustoće te fizikalno-kemijske stabilnosti. Sirovina za sušenje može biti vodena ili organska otopina, emulzija, disperzija i suspenzija (León-Martínez i sur., 2010). Cijeli se proces odvija u vremenskom okviru od nekoliko sekundi te daje konačni proizvod dobre kvalitete sa smanjenom aktivnošću vode i masom što rezultira lakšim skladištenjem i transportom (Ziaee i sur., 2019). Ovisno o karakteristikama sirovine i radnim uvjetima tijekom sušenja, sušenjem se dobije vrlo fini prah (10-50  $\mu\text{m}$ ) ili veće čestice (2-3 mm) (Gharsallaoui i sur., 2007). Postupak sušenja raspršivanjem prati četiri glavna koraka (slika 5): 1) raspršivanje (atomizacija) tekućeg uzorka, 2) kontakt uzorka sa strujom vrućeg zraka kojom se ostvaruje sušenje, 3) isparavanje vode iz raspršenih kapljica te 4) odvajanje osušenog praha i zraka (Selvamuthukumaran i sur., 2019).



**Slika 5.** Shematski prikaz postupka sušenja raspršivanjem (prema Selvamuthukumaran i sur., 2019)

Prvi korak označuje ulazak tekućeg uzorka u raspršivač kroz mlaznice pod djelovanjem tlaka ili komprimiranog plina gdje se raspršuje u obliku aerosola na veći broj sitnih kapljica jednake veličine (Murugesan i Orsat, 2012). Time se ostvaruje povećan omjer površine i volumena kapljica što je jedan od glavnih ciljeva ove metode (Ziaee i sur., 2019). Zbog toga javlja se veći prijenos topline i mase te stupanj isparavanja vode (Murugesan i Orsat, 2012). Raspršivanje je ključan dio procesa sušenja raspršivanjem zbog utjecaja na veličinu, oblik, strukturu, brzinu i raspodjelu kapljica. Također, utječe na konačnu veličinu čestica te dolazi do minimalnog gubitka termolabilnih spojeva (Anandharamakrishnan i Padma, 2015). Najčešće korištene vrste raspršivača su raspršivači s rotirajućim diskovima,

raspršivači s tlačnim mlaznicama i raspršivači s pneumatskim mlaznicama (Ziaee i sur., 2019). Zatim raspršene kapljice dolaze u kontakt sa strujom vrućeg plina unutar komore za sušenje te tako započinje sami proces sušenja. Za struju vrućeg plina, najčešće se koristi zrak, dok se rjeđe koristi inertni plin poput dušika. To ovisi o izboru, stabilnosti i osjetljivosti uzorka na kisik koji se treba sušiti, načinu kontakta tekućeg uzorka i medija za sušenje koji može biti istosmjernan, protusmjernan i miješani tok te potrebom za kondenzatorom (Murugesan i Orsat, 2012; Aundhia i sur., 2011). U komoru za sušenje ulazi zrak koji je prethodno izravno zagrijan pomoću izmjenjivača topline. U samo nekoliko sekundi vrući zrak može ispariti do 95 % vode iz kapljica te ih prevesti u prah. Kontakt između kapljica i vrućeg zraka te ulazna temperatura zraka znatno utječu na brzinu sušenja, konačni sadržaj vlage i svojstva praškastog proizvoda (More Swati i Wagh, 2014). U procesu sušenja raspršivanja ulja temperature ulaznog zraka kreću se u rasponu 150-250 °C, dok su temperature izlaznog zraka 50-80 °C (Mohammed i sur., 2020). Proces sušenja odvija se u dvije faze. U prvoj fazi uklanja se slobodna voda iz uzorka konstantnom brzinom sušenja, dok se u drugoj fazi uklanja vezana voda padajućom brzinom sušenja. Tada još dolazi do formiranja zaštitnog sloja (kore) na površini zato što je sadržaj vode u kapljici dosegno kritičnu vrijednost. Sušenje je završeno kada je temperatura čestice praha jednaka temperaturi zraka za sušenje (Phisut, 2012). U zadnjem dijelu procesa sušenja neophodno je odvojiti gotov proizvod iz struje zraka za sušenje. Primarno se odvajaju veće čestice praha na dnu komore za sušenje, dok se sekundarno odvajaju sitnije čestice praha u ciklonu (Murugesan i Orsat, 2012).

### 2.3.1. Utjecaj uvjeta sušenja raspršivanjem na stabilnost biološki aktivnih spojeva

Premda se smatra postupkom dehidracije, danas sve češću primjenu ima tehnika sušenja raspršivanjem pri inkapsulaciji gotovo svih vrsta sastojaka hrane, kao npr. enzima, bioaktivnih peptida i molekula, probiotika i drugih mikroorganizama, antioksidanata, vitamina, minerala, prirodnih bojila za hranu, omega-3 ulja, koji imaju visoku biološku i antimikrobnu aktivnost te antioksidacijski kapacitet (Piñón-Balderrama i sur., 2020). Cilj sušenja raspršivanjem je očuvanje termolabilnih spojeva hrane te proizvodnja visoko stabilnih proizvoda, zbog niskog sadržaja vlage i aktivnosti vode. Proizvodi su otporni na mikrobiološku i oksidativnu degradaciju, oksidaciju lipida, autooksidaciju i druge enzimske aktivnosti (Hartwig i sur., 2014).

Važan korak prije samog procesa sušenja raspršivanjem ulja je priprema adekvatne emulzije zato što se često inkapsuliraju lipofilni bioaktivni spojevi (npr.  $\beta$ -karoten) u vodenom pripravku. Emulzija predstavlja koloidni sustav dviju nemješivih tekućina. Radi toga je potrebno dodati emulgator (npr. Tween 20, Tween 80) koji ometa njihovo odvajanje. Također, emulzija utječe na konačnu veličinu čestica. Kapljice emulzije mogu se podijeliti na mikročestice (20-200 nm) i nanočestice (<100 nm). Njihova veličina je obrnuto proporcionalna stabilnosti spoju u njima. Problem predstavljaju kapljice emulzije s velikim promjerom zato što pri većoj brzini sušenja dolazi do njihove degradacije te se ne inkapsuliraju cijele, nego dio ostane na površiti kapljice. Kod ulja je to česta pojava zato što je podložno oksidaciji koja rezultira gubitkom biološki aktivnih spojeva (Anandharamakrishnan i Padma, 2015). Nanočestice imaju veći stupanj apsorpcije i bioraspoloživost inkapsuliranih biološki aktivnih spojeva zbog manjeg promjera čestice te veće dostupne površine u odnosu na mikročestice. Također, sprečava se stvaranje aglomerata prije sušenja zbog smanjenih privlačnih sila između njih (Lee i sur., 2011). Prilikom inkapsulacije biološki aktivnih spojeva stvara se zaštitni sloj koji ih inkorporira u stabilan prah čime se smanjuje njihova osjetljivost na temperaturu, kisik, svjetlost i vlagu (Di Battista i sur., 2015).

Velika pažnja se usmjerava na razvoj nosača i optimiranje drugih parametara sušenja s ciljem poboljšanja inkapsulacijske efikasnosti i stabilnosti inkapsuliranog spoja te njegovog kontroliranog otpuštanja u gastrointestinalnom traktu (Mar i sur., 2020). Materijali koji se koriste kao nosači u prehrambenoj industriji moraju biti priznati za sigurnu primjenu u hrani GRAS statusom („generally recognized as safe“- „općenito prepoznati kao neškodljivi“) ili od strane Agencije za hranu i lijekove (FDA) ili Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) (Anandharamakrishnan i Padma, 2015). Fizikalno-kemijska svojstva nosača imaju značajan utjecaj na proces sušenja. Karakteristika nosača je da pod različitim uvjetima vlage zraka, temperature i aktiviteta vode zadrže bioaktivne sastojke unutar kapsula s kojima ne reagiraju. Uz to, moraju imati dobre reološke karakteristike, dovoljnu propusnost membrane, sposobnost prevladavanja kiselog i enzimskog okruženja želuca, ali povećati prijanjanje i vrijeme zadržavanja aktivnih sastojaka u određenim dijelovima gastrointestinalnog trakta (Đorđević i sur., 2015). Također, nosač mora biti prikladnog blagog ili nikakvog okusa radi upotrebe za inkapsulaciju sastojaka hrane te ne smije izazvati alergijske ili toksične reakcije kod ljudi (Coimbra i sur., 2020). Kada se poveća omjer nosača i jezgre, učinkovitost inkapsulacije je povećana budući da pri niskim omjerima udio nosača može biti nedovoljan za potpuno inkapsuliranje kapljica materijala jezgre i to može rezultirati smanjenjem učinkovitosti

inkapsulacije (Minemoto i sur., 2002). Velika količina nosača smanjuje topljivost što rezultira otežanom inkapsulacijom te se inkapsulirani aromatski spojevi slabije zadržavaju u prahu (Jafari i sur., 2008). Nosači mogu biti biopolimeri velike molekulske mase poput škroba, modificiranog škroba i bjelančevina ili biopolimeri niže molekulske mase poput ciklodekstrina i maltodekstrina (Coimbra i sur., 2020).

Arapaska guma je polisaharidni nosač koji se koristi za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva zbog visoke topljivosti u vodi, niske viskoznosti i dobrih emulgirajućih svojstava (Mar i sur., 2020; Gupta i sur., 2015). Dodatna prednost je što je bez boje, okusa i mirisa (Jafari i sur., 2016). Neke od mana su visoka cijena i limitirana dostupnost (Gupta i sur., 2015). Pri niskom aktivitetu vode mikrokapsule izgrađene od arapske gume sušenjem raspršivanjem su stabilne te održavaju stabilnost jezgre do 200 dana. Međutim, do gubitka jezgre dolazi pri aktivitetu vode većem od 0,74 te mikrokapsule gube stabilnost i započinje postupak otapanja nosača (Rascon i sur., 2011). Arapska guma može djelovati kao stabilizator i emulgator zbog udjela proteina u samoj strukturi što omogućuje dobru sposobnost za stvaranje mikrokapsula te za emulgiranje s uljima (Ramirez i sur., 2015). Đorđević i sur. (2015) ukazali su da struktura arapske gume uzrokuje agregaciju s bioaktivnim spojevima koje vjerojatno zadržava poput vakuola. Međutim, razgranata struktura arapske gume je polupropusna membrana za kisik, što dovodi do samo djelomične zaštite od oksidacije (Samantha i sur., 2015).

Za dobivanje konačnog stabilnog praha s visokim inkapsulacijskim prinosom, potrebno je odrediti optimalnu ulaznu i izlaznu temperaturu zraka prilikom provedbe postupka sušenja raspršivanjem (Mohammed i sur., 2020). Pri visokim ulaznim temperaturama dolazi do veće brzine prijenosa topline na česticu što rezultira smanjenjem vlage te većim prinosom u konačnom prahu (Anandharamakrishnan i Padma, 2015). Pri visokim temperaturama može doći do narušavanja stabilnosti biološki aktivnih spojeva zbog njihove osjetljivosti na visoku temperaturu (Arpagaus, 2019). U istraživanju Rocha i sur. (2012) uspoređivala se inkapsulacijski prinos likopena i  $\beta$ -karotena. Inkapsulacijski prinos se snizio za 21,01-29,73 % kod likopena, kada su se ulazna i izlazna temperatura povećale s 170 °C na 180 °C, odnosno s 95 °C na 98 °C u odnosu na  $\beta$ -karoten. Razlog tomu je što je likopen više podložan većoj brzini oksidacije pri visokim temperaturama zbog visokog stupnja nezasićenja. Također, visoka ulazna temperatura zraka može narušiti ravnotežu tijekom isparavanja vode i brzine formiranja čestice što rezultira smanjenom inkapsulacijskim prinosom (Shu i sur., 2006). Uz to, pri previsokim ulaznim temperaturama dolazi do ekstremnog isparavanja vode i



puknuća na membrani čestice što posljedično dovodi do preranog otpuštanja inkapsuliranog sadržaja te njegovog propadanja (Gharsallaoui i sur., 2007). Međutim, prilikom upotrebe niske ulazne temperature zraka dolazi do manje brzine isparavanja pri čemu se formira mikročestica visoke gustoće, s visokim udjelom vode, niskom fluidnošću te većoj mogućnosti aglomeracije. Također, čestice se lako mogu zalijepiti za unutarnju stijenkku komore za sušenje što rezultira niskim prinosom (Gharsallaoui i sur., 2007). Tijekom postupka sušenja, ulazna temperatura se smanjuje zbog toga što je plin izložen raspršenim kapljicama. Iz tog razloga ova varijabla utječe na izlaznu temperaturu (Anandharamakrishnan i Padma, 2015).

Sve veću zabrinutost izazivaju sintetički dodaci u hrani pa je velika pozornost usmjerena na inkapsulaciju bioaktivnih spojeva iz biljaka i nusproizvoda prehrambene industrije. Radi toga potrebno je optimizirati inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem s boljim prinosom biološki aktivnih spojeva i inkapsulacijskom učinkovitosti te njihovu stabilnost tijekom skladištenja u različitim uvjetima kao i njihovo otpuštanje u gastrointestinalnom traktu (Assadpour i Jafari., 2020).

### 2.3.2. Primjena prahova u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

Sve veći je znanstveni utjecaj na osviještenost potrošača o pravilnoj prehrani s ciljem poboljšanja kvalitete života. Tijekom godina prehrambena industrija okrenula se razvoju i proizvodnji hrane u obliku prahova (Mohammed i sur., 2020). Razlog tomu je potreba za produljenjem roka trajnosti hrane, očuvanjem nutritivne vrijednosti te zainteresiranost potrošača za raznovrsnošću prehrambenih proizvoda (Fitzpatrick i Ahrne, 2005). Zadnjih nekoliko godina povećala se upotreba biljnih pripravaka u obliku dodataka prehrani ili alternativnih lijekova. Biljni pripravci mogu se pronaći u obliku tekućih pripravaka (čaj, tinktura) i prahova (osušeno i usitnjeno bilje ili pripravci dobiveni iz suhih ili tekućih biljnih ekstrakata) koji su dostupni u obliku kapsula i tableta (Banker i Rhodes, 2002). Prednost suhih ekstrakata u odnosu na tekuće je to što mogu zadržati visoku koncentraciju i stabilnost biološki aktivnih spojeva. Također, kasnije ih je jednostavno upotrijebiti te pokazuju niže troškove transporta i skladištenja. Sušenje raspršivanjem nudi značajne ekonomske prednosti u odnosu na druge metode poput liofilizacije bez obzira na to što je sam proces optimizacije parametara sušenja skup i dugotrajan (Ziaee i sur., 2019). Sušenje raspršivanje ima veliku primjenu za inkapsulacijom biljnih ekstrakata, enzima, esencijalnih i biljnih ulja te aroma (Cortés-Rojas i Oliveira, 2012).

U zadnje vrijeme sve se više koristi inkapsulirano ulje u prehrambenim proizvodima poput mliječnih proizvoda, mesnih prerađevina, keksa, peciva i juha (Jafari i sur., 2008). Cilj prehrambene industrije je dobiti kvalitetan i siguran proizvod. Zbog toga je cijeli proces proizvodnje potrebno dobro kontrolirati i obaviti u adekvatnim uvjetima kako bi se proizvod zaštitio od kontaminacije mikroorganizmima, virusima te nepoželjnih kemijskih spojeva (Fitzpatrick i Ahrne, 2005). U uljima prisutne nezasićene masne kiseline lako mogu oksidirati što dovodi do užeglosti ulja naročito kada je ulje izloženo visokoj temperaturi, svjetlosti, vlazi te visokoj koncentraciji kisika. Metoda sušenja raspršivanjem je najuspješnija i najprihvatljivija metoda inkapsulacije ulja zato što zaustavlja oksidaciju lipidnih spojeva te produžuje rok trajanja i omogućuje daljnju upotrebu ulja (Anandharamkrishnan i Padma, 2015). Također, kod ribljih ulja uspješno je maskiran neugodan miris i okus (Jafari i sur., 2008).

U farmaceutskoj industriji metoda sušenja raspršivanjem primarno služi za proizvodnju lijekova male molekulske mase i niske topljivosti premda se sve više primjenjuje i u procesima gdje se dobivaju velike biomolekule (Ziaee i sur., 2019). Lijekovi koji se pojavljuju u kristalnom obliku teško su biorasploživi ljudskom organizmu zato što su netopljivi u vodi, usporena je apsorpcija te ponekad ne izazivaju terapijski učinak. Zbog toga su metodom sušenja raspršivanjem postali dostupniji i učinkovitiji u organizmu. Inkapsulacija može utjecati na vremenski period u kojem će se čestice praha otpustiti u organizam, odnosno utječe na sadržaj odgovarajuće količine ljekovite tvari koja se ispušta na određenom mjestu za učinkovito i sigurno djelovanje u određenom vremenu (Leuenberger i Lanz, 2005). Primjer toga su lijekovi za alergiju, glavobolju i protiv prehlade koji mogu imati učinak 6 ili 12 sati nakon konzumacije. Kod liječenja kroničnih bolesti učinkovito djelovanje imaju lijekovi s reduciranom koncentracijom, a produženim djelovanjem. Svaki farmaceutski proizvod ima određenu veličinu, tvrdoću, fizikalnu, kemijsku i mikrobiološku stabilnost koja utječe na rok trajanja (Afoakwah i sur., 2012). Osim tableta, farmaceutska industrija u praškastom obliku proizvodi aerosole, cjepiva, suspenzije i kreme (Aundhia i sur., 2011).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak ulja pulpe pasjeg trna

U ovom istraživanju korišteno je ulje pulpe pasjeg trna dobiveno ekstrakcijom superkritičnim CO<sub>2</sub> pri temperaturi od 35 °C, tlaku 276 bara te vremenu ekstrakcije od 90 minuta. Do provođenja postupka sušenja raspršivanjem ulje je skladišteno na temperaturi 2-8 °C.

##### 3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda (MilliQ-Plus, Millipore)
- Arapska guma u prahu (Acros Organics, Belgija)
- Emulgator TWEEN 20 (BP 337-100, 100 mL, SAD)
- Izopropilni alkohol G.R., iso reagent (Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Kvarcni pijesak (Sand, Sea, Acid washed, Fisher Scientific, Velika Britanija)
- Zasićena otopina NaCl

*Priprema:* U destiliranoj vodi NaCl se otapa sve do zasićenja.

#### **Kemikalije za ekstrakciju tokoferola i karotenoida**

- Heksan G.R. (Lach-Ner s.r.o., Češka)

#### **Reagensi za određivanje tokoferola HPLC metodom uz FLD detektor**

- Izopropanol G.R., iso reagent (Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Standard  $\alpha$ - tokoferola (Sigma Aldrich, USA)

*Priprema:* Početna otopina standarda  $\alpha$ -tokoferola, početne koncentracije 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pripravi se otapanjem 1 mg standarda u 10 mL n-heksana. Iz početne otopine standarda pripreme se odgovarajuća razrjeđenja s n-heksanom u rasponu od 0,2 do 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **Reagensi za određivanje karotenoida HPLC metodom uz PDA detektor**

- Metanol (Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Metil terc-butil eter (Lach-Ner s.r.o., Češka)

Standardi:

- $\beta$ -karoten (Sigma Aldrich, USA)
- Lutein (Sigma Aldrich, USA)

*Priprema:* Otopine standarda  $\beta$ -karotena i luteina, početne koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripreve se otapanjem 1 mg standarda u 10 mL n-heksana. Iz početne otopine standarda pripreme se razrjeđenja standardnih otopina s n-heksanom u rasponu  $6,67\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

- Trolox standard (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Acros Organics, USA)
- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid, 98%) (Acros Organics, Belgija)
- Fluorescein (Riedel-de Haen, Njemačka)
- Metoksilirani  $\beta$ -ciklodekstrin (Acros Organics, USA)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH = 7,5)

*Priprema:* Odvaže se 5,09 g natrijevog fosfata dihidrata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) i 6,32 g dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) i otopi u 1000 mL destilirane vode na magnetskoj mješalici (IKAMAG RET-G, Njemačka) uz stalno mjerenje pH (pH-metar, inoLab pH 7110, Njemačka) te se dodaju peleti NaOH dok se ne postigne pH=7,5. Svaki dan je potrebno pripremiti svježu otopinu.

- Fluorescein (63,0 nM)

- Otopina 1

*Priprema:* Otopi se 22,5 mg fluoresceina u 50 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,5)

- Otopina 2

*Priprema:* Od otopine 1 se uzme  $24,5 \mu\text{L}$  te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,5). Svaki dan se pripravljaju svježja razrjeđenja otopina fluoresceina.

- Otopina AAPH (240 mM)

*Priprema:* Otopi se 0,651 g AAPH u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH=7,5).

- Otopina 7 % RMCD

*Priprema:* Otopi se 7 g metoksiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina u 100 mL 50 % acetona.

- Otopina standarda – Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)

*Priprema:* Početna („stock“) otopina trolox, početne koncentracije 103,99  $\mu$ M pripravi se otapanjem 2,6 mg troloxa u 100 mL 7 % RMCD. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja sa 7 % RMCD-a (3,12-103,99  $\mu$ M).

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Uređaj za sušenje raspršivanjem SD 06 (LabPlant, Velika Britanija)
- Tehnička vaga (točnost  $\pm 0,01$  g) (Mettler PM600, Švicarska)
- Analitička vaga (točnost  $\pm 0,0001$  g) (Sartorius AG, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik (Núve FN 500, Turska)
- Eksikator
- Ultra turrax (IKAT25 digital, 220-240 V, Njemačka)
- Magnetska miješalica (IKAMAG RET-G, Njemačka)
- Vortex miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- Soxhlet uređaj za ekstrakciju (Gerhardt, Njemačka)
- Rotacioni vakuum uparivač – rotavapor (IKA RV10 basic, Njemačka)
- Centrifuga (Hermle Z 206A, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma Elmasonic s40H, Njemačka)
- CLARIOstar uređaj (BMG LabTech, Offenburg, Njemačka)
- HPLC uređaj (Agilent Technologies 1260 Infinity, SAD)

#### Pribor:

- Laboratorijske čaše (400 mL, 500 mL i 600 mL)
- Erlenmeyerova tikvica (300 mL)
- Menzura (10 mL, 25 mL, 500 mL i 1000 mL)
- Falcon kivete (14 mL i 50 mL)

- Odmjerne tikvice (5 mL)
- Tikvice s okruglim dnom (25 mL)
- Viale (1,5 mL)
- Automatske mikropipete (10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L, 0,5-5 mL)
- 0,45  $\mu$ m filter Chromafil Xtra Pet (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka)
- Filter papir
- Magneti
- Špatula
- Stakleni štapić
- Epruvete
- Aluminijske posudice
- Keramičke posudice
- Parafilm
- Plastična žličica
- Stakleni lijevak za filtriranje
- Medicinska šprica i igla
- Mikrotitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)

### **3.2. METODE RADA**

#### 3.2.1. Priprema uzorka za sušenje raspršivanjem

U laboratorijsku čašu izvaže se određena količina arapske gume te otopi u destiliranoj vodi i homogenizira pomoću uređaja Ultra turraxa. Dobivena smjesa stavi se 24 h/ 50 °C na magnetskoj miješalici (slika 6a). Nakon toga, doda se emulgator TWEEN 20 te se smjesa homogenizira, a zatim se doda 20 g ulja te se smjesa ponovno homogenizira pomoću Ultra turraxa (slika 6b) i tako dobivena smjesa se podvrgava sušenju raspršivanju.



a)



b)

**Slika 6.** a) Otopljena arapska guma u destiliranoj vodi nakon 24 h na magnetskoj miješalici (vlastita fotografija); b) Uzorak ulja se homogenizira zajedno s već pripremljenom smjesom na uređaju Ultra turrax prije procesa sušenja raspršivanjem (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Proizvodnja praha iz ulja pulpe pasjeg trna primjenom sušenja raspršivanjem

Postupak sušenja raspršivanjem proveden je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Zadru, pomoću uređaja za sušenje raspršivanjem SD 06 (LabPlant, Velika Britanija) (Slika 7).



**Slika 7.** Uređaj za sušenje raspršivanjem (vlastita fotografija)

Parametri koji su tijekom procesa sušenja bili konstantni su: protok zraka  $10 \text{ m s}^{-1}$ , srednja brzina deblokiranja mlaznice, protok ulaznog materijala  $485 \text{ mL h}^{-1}$  te temperatura izlaznog zraka u rasponu  $65\text{-}85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Sukladno postavljenom cilju rada koji je bio proizvesti prah ulja pulpe pasjeg trna sušenjem raspršivanjem te utvrditi utjecaj temperature ( $120$ ,  $150$  i  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i omjera ulja i nosača ( $1:2$ ,  $1:3$  i  $1:4$ ) na maseni udio tokoferola i karotenoida te na antioksidacijski kapacitet definiran je plan eksperimenta.

Plan i eksperimentalni dizajn pokusa naveden je u tablici 1. Prema punom faktorijalnom dizajnu proizvedeno je 9 prahova na različitim temperaturama ( $120$ ,  $150$  i  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) s različitim omjerom ulja i nosača ( $1:2$ ,  $1:3$  i  $1:4$ ). Proizvedeni prahovi skladišteni su u hermetički zatvorenim Falcon plastičnim kivetama u hladnjaku do provođenja daljnjih analiza.



**Tablica 1.** Plan i eksperimentalni dizajn pokusa sušenja raspršivanjem ulja pulpe pasjeg trna primjenom različite temperature te različitog omjera ulja i nosača

| Uzorak | Nosač        | Omjer ulja i nosača | Emulgator (g) | Temperatura (°C) |
|--------|--------------|---------------------|---------------|------------------|
| 1      | Arapska guma | 1:2                 | 1             | 120              |
| 2      |              | 1:3                 |               |                  |
| 3      |              | 1:4                 |               |                  |
| 4      |              | 1:2                 |               | 150              |
| 5      |              | 1:3                 |               |                  |
| 6      |              | 1:4                 |               |                  |
| 7      |              | 1:2                 |               | 180              |
| 8      |              | 1:3                 |               |                  |
| 9      |              | 1:4                 |               |                  |

### 3.2.3. Ekstrakcija tokoferola i karotenoida iz praha ulja pulpe pasjeg trna potpomognuta ultrazvukom

Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz praha ulja pulpe pasjeg trna koristila se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom zato što frekvencije ultrazvuka 20-100 kHz i intenziteta 1-1000 W cm<sup>-2</sup> izazivaju strukturne promjene biljnog materijala i time se olakšava prodor ekstrakcijskog otapala zbog čega je vrijeme trajanja ekstrakcije kraće, smanjuju se troškovi i volumen otapala, a kvaliteta dobivenih ekstrakata je poboljšana (Vinatoru, 2001).

#### Postupak ekstrakcije:

U epruvetu tip falcon (15 mL) odvaži se 4±0,01 g uzorka praha te otopi u 10 mL otapala n-heksana. Dobivena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji 30 min na 30 °C.

Nakon ekstrakcije smjesa se centrifugira 10 min pri  $6000 \text{ o min}^{-1}$ . Potom se supernatant 1 profiltrira kroz filter papir u tikvicu s okruglim dnom. Talog nakon filtracije se ponovno ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji u 10 mL n-heksana 30 min na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  te centrifugira 10 min pri  $6000 \text{ o min}^{-1}$ . Supernatant 2 se profiltrira u istu tikvicu gdje se nalazi supernatant 1, te se otapalo otpari pomoću rotavapora na temperaturi od  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dobiveno ulje otopi se u 4 mL n-heksana te se prelije u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni do oznake n-heksanom.

### 3.2.4. Određivanje tokoferola HPLC metodom uz fluorescentni detektor (FLD)

#### Princip metode:

Tekućinska kromatografija je vrsta kromatografske metode u kojoj se smjesa spojeva rastavlja na sastavne spojeve na temelju različitosti njihovih afiniteta prema stacionarnoj i mobilnoj fazi prilikom prolaska kroz kromatografsku kolonu (Fallon i sur., 1990). Uzorak se razdvaja u zone (vrpce) koje se kontinuirano pomiču kroz kolonu, izlaze iz kolone i ulaze u detektor koji ispisuje eluciju jedne ili više kromatografskih vrpce u obliku pika. Stacionarna faza je nepolarna, a mobilna polarnija pa se spojevi eluiraju u nizu padajuće polarnosti. Udio razdvojenog spoja u eluiranoj vrpce proporcionalan je visini pika na kromatogramu. Pikovi se identificiraju po vremenu zadržavanja na kromatografskoj koloni (Krull i Szulc, 1997).

Koncentracija tokoferola u ispitivanim uzorcima određena je visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) uz fluorescentni detektor (FLD). Jedan je od detektora vrlo visoke osjetljivosti i selekcije, detektira spojeve u rasponu koncentracija od  $\text{ng mL}^{-1}$  do  $\text{pg mL}^{-1}$ .

#### Priprema uzorka:

Za određivanje tokoferola u uzorcima,  $1 \pm 0,01$  g ulja je otopljeno u 5 mL n-heksana. Prije injektiranja u HPLC uređaj, uzorci se profiltriraju kroz  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  filter u viala za injektiranje.

#### Postupak rada:

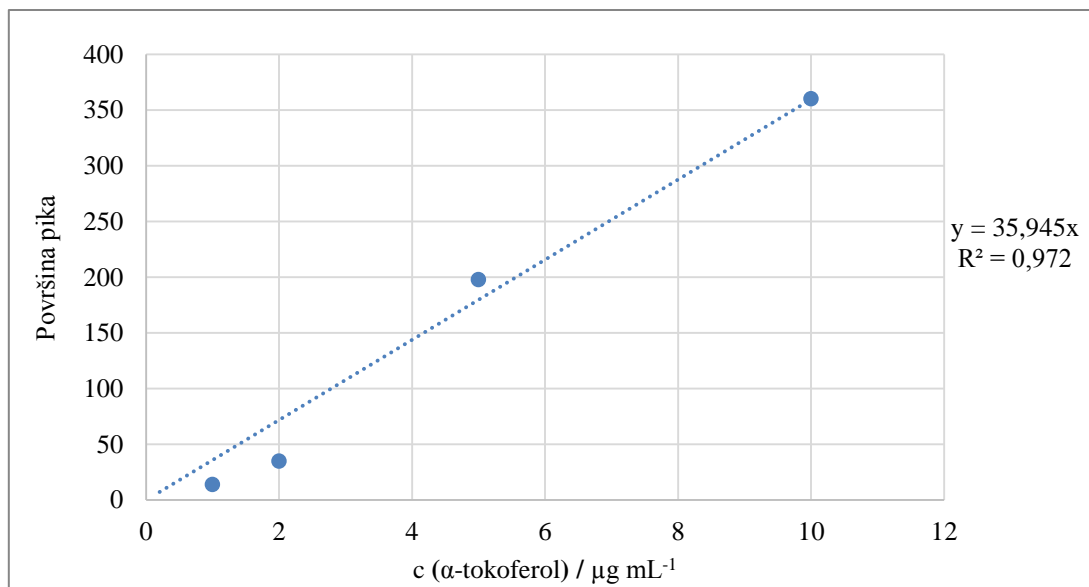
Određivanje tokoferola provedeno je prema standardnoj metodi (HRN EN ISO 9936:2007) uz primjenu HPLC uređaja Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies,

SAD) i FLD, izokratskom metodom normalnih faza. Određivanje je provedeno prema sljedećim kromatografskim uvjetima:

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kolona:</b>                      | LiChroCART, Silica 60, 5 $\mu\text{m}$ (250 x 4,6 mm), Merck |
| <b>Pokretna faza:</b>               | otapalo A: heksan:izopropanol (99,3:0,7 v/v)                 |
| <b>Temperatura kolone:</b>          | sobna  |
| <b>Brzina protoka:</b>              | 0,9 mL min <sup>-1</sup> 100% A                              |
| <b>Vrijeme analize:</b>             | 25 min   |
| <b>Detektor:</b>                    | Fluorescentni detektor (FLD)                                 |
| • <b>Valna duljina ekstinkcije:</b> | 295 nm   |
| • <b>Valna duljina emisije:</b>     | 330 nm   |
| <b>Osjetljivost detektora:</b>      | srednja  |
| <b>Injektirani volumen:</b>         | 20 $\mu\text{L}$   |

#### Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Standardna otopina  $\alpha$ -tokoferola pripravljena je otapanjem u n-heksanu u odgovarajućim razrjeđenjima (0,2-10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Iz površine pikova i masenih koncentracija standardnih otopina dobije se baždarni pravac i izračuna pripadajuća jednadžba pravca koja se koristi za izračunavanje koncentracije pojedinačnih tokoferola u analiziranim uzorcima izraženo kao  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Slika 8.** Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u analiziranim uzorcima

Na temelju rezultata jednadžba pravca za koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) glasi [1]:

$$y = 35,945 \cdot x \quad [1]$$

gdje je:

y - površina ispod pika,

x - koncentracija  $\alpha$ -tokoferola ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2.5. Određivanje karotenoida HPLC metodom uz PDA detektor

#### Princip metode:

Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (High Performance Liquid Chromatography) (HPLC) uz UV-Diode Array detekciju korištena je za određivanje karotenoida u ispitivanom uzorku zbog visoke pouzdanosti i niske granice detekcije. DAD detektor primjenjuje se zato što u jednoj analizi daje precizne vrijednosti apsorbancije, te pokriva snimanje cijelog UV-Vis spektra svakog razdvojenog pika. Istovremeno je moguće dobiti kromatograme na nekoliko različitih valnih duljina (Krull i Szulc, 1997; Watson, 2005).

### Priprema uzorka:

Prije injektiranja u HPLC uređaj, dobiveni ekstrakti profiltriraju se kroz 0,45 µm filter u vialu za injektiranje.

### Postupak rada:

Određivanje pojedinačnih karotenoida ( $\beta$ -karotena, cis- $\gamma$ -karotena, luteina i njegovih derivata, zeaksantina i njegovih derivata) u ekstraktima prahova ulja pulpe pasjeg trna provedeno je prema metodi koju su prethodno opisali Castro-Puyana i sur. (2016) primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Identifikacija karotenoida provodi se usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom sa karakterističnim spektrima UV/VIS PDA standarda. Kvantitativne vrijednosti karotenoida izračunaju su iz jednadžbi baždarnih pravaca  $\beta$ -karotena i luteina.

Otapala korištena kao pokretne faze, prije korištenja odzrača se 1 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji (Elmasonic 4 H, Elma, Njemačka). Određivanje je provedeno prema sljedećim kromatografskim uvjetima:

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Kolona:</b>              | Develosil 3u RP-Aqueous C30 140A, 5 µm (250 x 4,6 mm I.D.)   |
| <b>Pokretna faza:</b>       | otapalo <b>A</b> : metanol (MeOH):metil terc-butil eter (MTBE):voda (90:7:3 v/v/v)<br>otapalo <b>B</b> : MeOH:MTBE (10:90 v/v) |
| <b>Detektor:</b>            | UV/VIS PDA   |
| <b>Eluiranje:</b>           | gradijentno – gradijent prikazan u tablici 2   |
| <b>Injektirani volumen:</b> | 10 µL  |
| <b>Detektor:</b>            | 450 nm i 660 nm  |

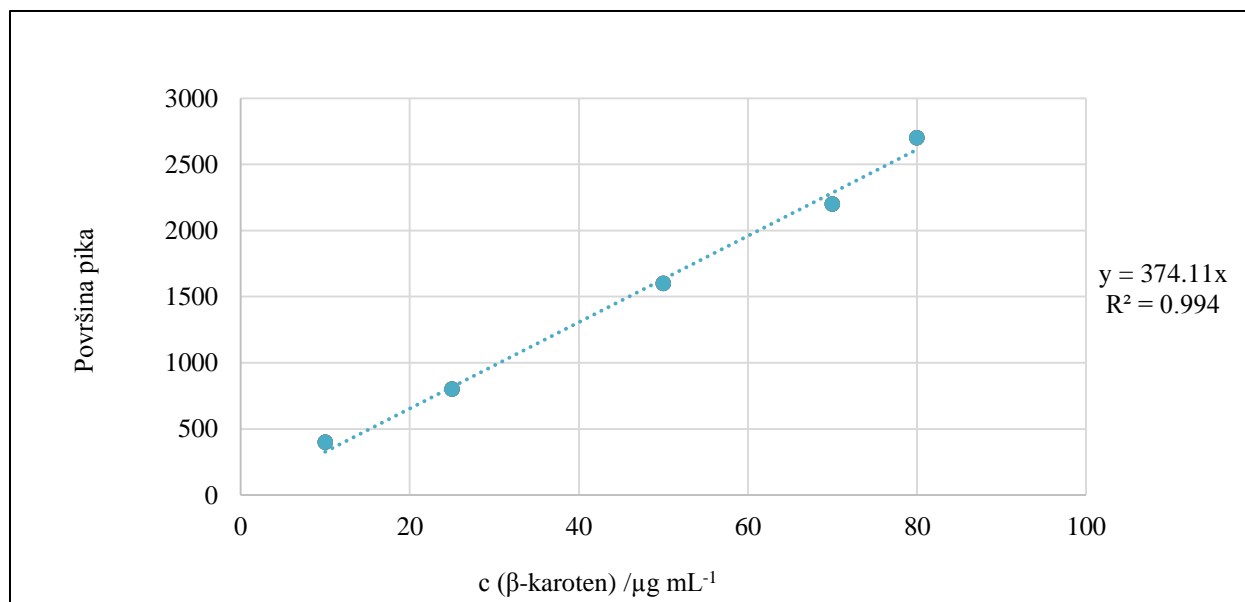
**Tablica 2.** Gradijent za HPLC-UV/PDA analizu karotenoida (Castro-Puyana i sur., 2016)

| t (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) | Protok (mL min <sup>-1</sup> ) |
|---------|---------------|---------------|--------------------------------|
| 0       | 100           | 0             | 0,8                            |
| 20      | 70            | 30            | 0,8                            |
| 35      | 50            | 50            | 0,8                            |
| 45      | 20            | 80            | 0,8                            |
| 50      | 0             | 100           | 0,8                            |
| 52      | 100           | 0             | 0,8                            |

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Standardne otopine β-karotena i luteina pripremljene su otapanjem u n-heksanu u rasponu 6,67-100 μg mL<sup>-1</sup>. Iz površine pikova i masenih koncentracija standardnih otopina dobiju se baždarni pravci i izračunaju pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard.

Kvantifikacija cis-γ-karotena izračunata prema jednadžbi baždarnog pravca za β-karoten [2], a zeaksantina prema jednadžbi baždarnog pravca za lutein [3].



**Slika 9.** Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije β-karotena u ispitivanim uzorcima

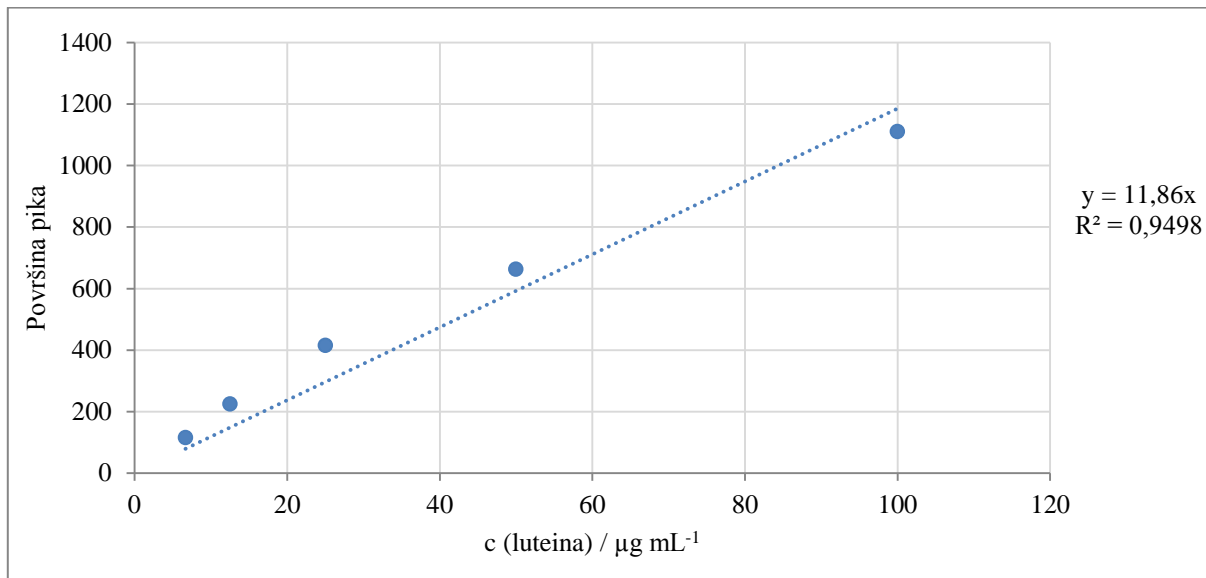
Na temelju rezultata jednadžba pravca β-karotena glasi

$$y = 374,11 \cdot x \quad [2]$$

gdje je:

y - površina ispod pika,

x - koncentracija  $\beta$ -karoten ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Slika 10.** Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije luteina u ispitivanim uzorcima

Na temelju rezultata jednadžba pravca luteina glasi:

$$y = 11,86 \cdot x \quad [3]$$

gdje je:

y - površina ispod pika,

x - koncentracija luteina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom

#### Princip metode:

ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) prema mehanizmu djelovanja spada u HAT (engl. Hydrogen Atom Transfer) metodu koja se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta antioksidansa topljivih u vodi (H-ORAC) i u

mastima (L-ORAC). Temelji se na prijenosu atoma vodika, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C (Prior, 2015). Huang i sur. (2002) su unaprijedili ORAC metodu za lipofilne antioksidanse koristeći metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin (RMCD) koji učinkovito povećava topljivosti lipidnih antioksidanasa u fosfatnom puferu.

#### Priprema uzoraka:

Prethodno dobiveni heksanski ekstrakti otpare se na rotavaporu na 70 °C do suha. Prema istraživanju koje su proveli Naguib i sur. (2003) korišten je omjer ulja i acetona 1:40 (w/v) gdje se 0,5 g dobivenog ulja otopi u 20 mL acetona. Potom se napravi razrjeđenje 1:1 sa 7 % RMCD otopinom te se inkubira 1 h u ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se promiješaju na vortex miješalici (3000 o min<sup>-1</sup>) te profiltriraju kroz 0,45  $\mu$ m filter. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka ORAC metodom, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka.

#### Postupak rada:

U 7 % RMCD pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja uzoraka i standardne otopine Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) dok su u 75 mM fosfatnom puferu (pH=7,5) pripremljene otopine fluoresceina (63,0 nM) i izvor radikala 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (240 mM).

U sve jažice mikrotitarske pločice otpipetira se 150  $\mu$ L otopine fluoresceina, a u odgovarajuće jažice 25  $\mu$ L uzorka ili 25  $\mu$ L 7% RMCD (slijepa proba) ili 25  $\mu$ L otopine standarda Troloxa odgovarajućih razrjeđenja za izradu baždarnog pravca. Ploča s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija ( $\lambda$  eks. 493 nm i  $\lambda$  em. 515 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25  $\mu$ L svježe pripremljenog AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgivača. Mjerenje intenziteta fluorescencije trajalo je 120 minuta.

Mjerenje je provedeno u duplikatu, a analiza dobivenih podataka napravljena je pomoću odgovarajućeg računalnog programa (MARS 2.0 software, BMG LabTech, Offenburg, Njemačka). Dobiveni su rezultati izraženi kao prosječne vrijednosti dvaju mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.



### 3.2.7. Izračun zadržavanja $\alpha$ -tokoferola i karotenoida te vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (L-ORAC) u odnosu na početno ulje

Zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (L-ORAC) u odnosu na početno ulje napravljeno je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ zadržavanja} = \frac{\text{maseni udio u ulju iz praha}}{\text{maseni udio u početnom ulju}} \cdot 100 \quad [4]$$

### 3.2.8. Obrada rezultata

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Multifaktorska analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdila važnost utjecaja pojedinih varijabli (omjer ulja i nosača; temperature) sušenja raspršivanjem na promatrane parametre (maseni udio  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida, te vrijednost L-ORACA-a). 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

Provedbom procesa sušenja raspršivanjem ulja pulpe pasjeg trna, proizvedeno je 9 prahova. Ispitan je utjecaj omjera ulja i nosača arapske gume (1:2, 1:3 i 1:4) pri različitim temperaturama sušenja (120, 150 i 180 °C) na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (L-ORAC) prahova dobivenih sušenjem raspršivanjem ulja pulpe pasjeg trna. Rezultati utjecaja parametara sušenja (omjer ulja i nosača, temperatura) na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (ORAC) prahova ulja pulpe pasjeg trna prikazani su u tablicama 3 i 4.

**Tablica 3.** Rezultati utjecaja parametara sušenja (omjer ulja i nosača, temperatura) na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (ORAC) prahova ulja pulpe pasjeg trna

| Uzorak   | Omjer ulja i nosača | Temperatura (°C) | $\alpha$ -tokoferol (mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | Ukupni karotenoidi (mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | L-ORAC ( $\mu$ mol TE $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) |
|----------|---------------------|------------------|---|--|---|
| ulje     | /                   | /                | 112,04 $\pm$ 2,83                                 | 187,49 $\pm$ 5,49                                | 1279,47 $\pm$ 8,55                              |
| <b>1</b> | <b>1:2</b>          | <b>120</b>       | 50,79 $\pm$ 1,26                                  | 88,36 $\pm$ 1,50                                 | 1199,73 $\pm$ 2,15                              |
| <b>2</b> | <b>1:3</b>          |                  | 43,24 $\pm$ 1,25                                  | 72,16 $\pm$ 1,77                                 | 929,50 $\pm$ 2,65                               |
| <b>3</b> | <b>1:4</b>          |                  | 38,93 $\pm$ 0,76                                  | 39,38 $\pm$ 1,13                                 | 1203,20 $\pm$ 1,43                              |
| <b>4</b> | <b>1:2</b>          | <b>150</b>       | 40,26 $\pm$ 1,85                                  | 15,37 $\pm$ 2,00                                 | 1128,63 $\pm$ 2,25                              |
| <b>5</b> | <b>1:3</b>          |                  | 45,48 $\pm$ 1,09                                  | 65,45 $\pm$ 0,98                                 | 1202,70 $\pm$ 2,03                              |
| <b>6</b> | <b>1:4</b>          |                  | 44,03 $\pm$ 1,09                                  | 40,07 $\pm$ 2,94                                 | 1200,78 $\pm$ 3,20                              |
| <b>7</b> | <b>1:2</b>          | <b>180</b>       | 49,15 $\pm$ 1,80                                  | 15,86 $\pm$ 0,79                                 | 805,99 $\pm$ 1,29                               |
| <b>8</b> | <b>1:3</b>          |                  | 46,54 $\pm$ 1,49                                  | 61,76 $\pm$ 1,60                                 | 655,42 $\pm$ 2,72                               |
| <b>9</b> | <b>1:4</b>          |                  | 41,16 $\pm$ 1,49                                  | 38,85 $\pm$ 1,23                                 | 623,47 $\pm$ 0,88                               |

**Tablica 4.** Multifaktorska analiza varijance (ANOVA) pojedinačnog i kombiniranog utjecaja parametara (omjer ulja i nosača, temperature) sušenja na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te na vrijednosti antioksidativnog kapaciteta prahova ulja pulpe pasjeg trna, na razini 95 %-tnog intervala pouzdanosti

| <b>Pojedinačni utjecaj omjera ulja i nosača</b>                 |  |   |   |
|---|--|---|---|
| <b>Omjer<br/>(ulje:nosač)</b>                                   | $\alpha$ -tokoferol<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | Ukupni karotenoidi<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | L-ORAC<br>( $\mu$ mol TE $10^{-2}$ g $^{-1}$<br>ulja) |
| <b>1:2</b>  | 46,73 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>                        | 39,86 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>                       | 1044,78 $\pm$ 3,57 <sup>c</sup>                       |
| <b>1:3</b>  | 45,08 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>                        | 66,46 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>                       | 930,11 $\pm$ 3,57 <sup>a</sup>                        |
| <b>1:4</b>  | 41,37 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>                        | 39,44 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>                       | 1015,84 $\pm$ 3,57 <sup>b</sup>                       |
| <b>Pojedinačni utjecaj temperature</b>                          |  |   |   |
| <b>Temperatura<br/>(°C)</b>                                     | $\alpha$ -tokoferol<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | Ukupni karotenoidi<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | L-ORAC<br>( $\mu$ mol TE $10^{-2}$ g $^{-1}$<br>ulja) |
| <b>120</b>  | 44,32 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>                        | 66,63 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>                       | 1117,48 $\pm$ 3,57 <sup>b</sup>                       |
| <b>150</b>  | 43,26 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>                        | 40,29 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>                       | 1178,29 $\pm$ 3,57 <sup>c</sup>                       |
| <b>180</b>  | 45,62 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>                        | 38,82 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>                       | 694,96 $\pm$ 3,57 <sup>a</sup>                        |
| <b>Kombinirani utjecaj omjera (ulja i nosača) i temperature</b> |  |   |   |
| <b>Omjer ulje:nosač;<br/>Temperatura (°C)</b>                   | $\alpha$ -tokoferol<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | Ukupni karotenoidi<br>(mg $10^{-2}$ g $^{-1}$ ulja) | L-ORAC<br>( $\mu$ mol TE $10^{-2}$ g $^{-1}$<br>ulja) |
| <b>1:2/120</b>  | 50,79 $\pm$ 1,103 <sup>e</sup>                       | 88,36 $\pm$ 1,18 <sup>e</sup>                       | 1199,73 $\pm$ 6,18 <sup>e</sup>                       |
| <b>1:2/150</b>  | 40,26 $\pm$ 1,103 <sup>a,b</sup>                     | 15,37 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>                       | 1128,63 $\pm$ 6,18 <sup>d</sup>                       |
| <b>1:2/180</b>  | 49,15 $\pm$ 1,103 <sup>d,e</sup>                     | 15,86 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>                       | 805,99 $\pm$ 6,18 <sup>b</sup>                        |
| <b>1:3/120</b>  | 43,24 $\pm$ 1,103 <sup>a,b,c,d</sup>                 | 72,16 $\pm$ 1,18 <sup>d</sup>                       | 929,50 $\pm$ 6,18 <sup>c</sup>                        |
| <b>1:3/150</b>  | 45,48 $\pm$ 1,103 <sup>b,c,d,e</sup>                 | 65,45 $\pm$ 1,18 <sup>c</sup>                       | 1202,70 $\pm$ 6,18 <sup>e</sup>                       |
| <b>1:3/180</b>  | 46,54 $\pm$ 1,103 <sup>c,d,e</sup>                   | 61,76 $\pm$ 1,18 <sup>c</sup>                       | 655,42 $\pm$ 6,18 <sup>a</sup>                        |
| <b>1:4/120</b>  | 38,93 $\pm$ 1,103 <sup>a</sup>                       | 39,38 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>                       | 1203,20 $\pm$ 6,18 <sup>e</sup>                       |
| <b>1:4/150</b>  | 44,03 $\pm$ 1,103 <sup>a,b,c,d</sup>                 | 40,07 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>                       | 1200,78 $\pm$ 6,18 <sup>c</sup>                       |
| <b>1:4/180</b>  | 41,16 $\pm$ 1,103 <sup>a,b,c</sup>                   | 38,85 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>                       | 623,47 $\pm$ 6,18 <sup>a</sup>                        |

#### 4.1. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA MASENI UDIO $\alpha$ -TOKOFEROLA U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA

U ulju pulpe pasjeg trna (početni uzorak) te u prahovima proizvedenim procesom sušenja raspršivanje, visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) kvantificiran je samo  $\alpha$ -tokoferol.

Maseni udio  $\alpha$ -tokoferola u početnom uzorku ulja iznosio je  $112,04 \text{ mg } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  ulja, dok je maseni udio  $\alpha$ -tokoferola u prahovima proizvedenim sušenjem raspršivanjem bio u rasponu od  $38,93$  do  $50,79 \text{ mg } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  ulja (tablica 3). U odnosu na početno ulje zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola u svim prahovima iznosilo je od  $34,75$  ( $1:4/120 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do  $45,33$  ( $1:2/120 \text{ }^\circ\text{C}$ ) %.

Najviši maseni udjeli  $\alpha$ -tokoferola određeni su u prahovima dobivenima pri  $120$  i  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ , s omjerom ulja i nosača  $1:2$ . Općenito, prahovi koji su imali veći omjer ulja i nosača imali su niži maseni udio  $\alpha$ -tokoferola što je u skladu sa rezultatima istraživanja Tonona i sur. (2011). Dobiveni rezultati su također u skladu su s istraživanjima Ogradowska i sur. (2019; 2020) gdje je veće zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola bilo u prahovima ulja noćurka ( $51 \%$ ) i obične lisičine ( $95,6 \%$ ) te ulja sjemenki: šafrana ( $45,1 \%$ ), uljane repice ( $83,2 \%$ ) i lana ( $99,4 \%$ ) s manjim omjerom ulja i nosača ( $1:2$ ) i pri niskoj ulaznoj temperaturi ( $130 \text{ }^\circ\text{C}$ ). U navedenim istraživanjima kao nosač se koristila kombinacija maltodekstrina, koncentrata proteina sirutke i arapske gume, a omjer ulja i smjese nosača iznosio je  $1:2$ . Vjerojatno je smjesa nosača različitog kemijskog sastava pridonijela boljoj zaštiti i zadržavanju  $\alpha$ -tokoferola u samom prahu (Özbek i Ergönül, 2017). Suprotno tome, rezultati istraživanja Rosenberg i sur. (1990) pokazali su veće zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola pri većim omjerima ulja i nosača.

Prema istraživanju Chang i sur. (2005) manji omjeri ulja i nosača pokazali su umjerenu učinkovitost inkapsulacije. Naime, najniži maseni udio  $\alpha$ -tokoferola određen je u prahu sušenom pri  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , s omjerom ulja i nosača  $1:4$ . Međutim, u istraživanju Selamat i sur. (2018) zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola ( $59,9$ - $71,5 \%$ ) u inkapsuliranom palminom ulju pri niskoj ulaznoj temperaturi i većim omjerima ulja i nosača bilo je zadovoljavajuće.

Veći gubici  $\alpha$ -tokoferola su također primjećeni kod viših temperatura sušenja vjerojatno zbog pucanja kemijskih veza kojim je  $\alpha$ -tokoferol vezan za druge organske spojeve poput proteina ili fosfolipida (Ogradowska i sur., 2020).

S druge strane, istraživanje Tarigana i sur. (2018) pokazuje da se pri vrlo visokim ulaznim temperaturama ( $180$ - $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ), manjim omjerom ulja i nosača ( $1:2$ ) može enkapsulirati

više od 50 % vitamina E iz palminog ulja. Kao nosač korištena je samo arapska guma ili u kombinaciji s polisaharidom galaktomananom iz palme *Arenga pinnata*. Aghbashlo i sur. (2012) su utvrdili da pri višim ulaznim temperaturama se povećava brzina sušenja čestice, te se time prije formira površinska kora čestice, koja sprečava daljnji gubitak sadržaja čestice.

Rezultati statističke analize pojedinačnog i kombiniranog utjecaja omjera ulja i nosača te temperature na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su u tablici 4. Prema rezultatima multifaktorske analize varijance (ANOVA) omjer ulja i nosača statistički je značajno utjecao na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola, dok niti jedna od primijenjenih temperatura nije pokazala statistički značajan utjecaj na zadržavanje  $\alpha$ -tokoferola u inkapsuliranom ulju. Kod kombiniranog utjecaja najviši maseni udio  $\alpha$ -tokoferola određen je u prahu dobivenom pri 120 °C, s omjerom ulja i nosača 1:2. Povećanjem omjera na 1:3 dolazi do značajnog pada masenog udjela  $\alpha$ -tokoferola, dok daljnje povećanje na omjer 1:4 nije imalo značajan utjecaj. Pri temperaturama od 150 i 180 °C nije zabilježen statistički značajan utjecaj omjera ulja i nosača na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola.

#### 4.2. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA MASENI UDIO KAROTENOIDA U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA

U ulju pulpe pasjeg trna (početni uzorak) te u prahovima proizvedenim procesom sušenja raspršivanjem, visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) kvantificirani su ukupni karotenoidi.

Maseni udio karotenoidnih pigmenata u početnom uzorku ulja iznosio je 187,49 mg  $10^{-2}$  g<sup>-1</sup> ulja, dok je maseni udio karotenoida u prahovima proizvedenim sušenjem ulja pulpe pasjeg trna bio u rasponu od 15,37 do 88,36 mg  $10^{-2}$  g<sup>-1</sup> ulja (tablica 3). U odnosu na početni uzorak ulja zadržavanje karotenoida u prahovima iznosilo je od 8,20 (1:2/150 °C) do 47,13 (1:2/120 °C) %.

Najviši maseni udio karotenoida određen je u uzorku osušenom pri 120 °C, s omjerom ulja i nosača 1:2, dok je najniži maseni udio određen u uzorcima osušenim pri 150 i 180 °C, s omjerom nosača i ulja 1:2. U prahovima ulja pulpe pasjeg trna s manjim omjerima ulja i nosača (1:2 i 1:3) došlo je do smanjenja masenog udjela karotenoida povećanjem temperature sušenja. Suprotno tome, u istraživanju Rodriduez-Huezo i sur. (2004) manji omjer ulja i nosača imao je bolji utjecaj na zadržavanje karotenoida. U istraživanju Ferreira i sur. (2021) pri omjeru ulja i nosača 1:3 zadržano je više od 70 % karotenoida u inkapsuliranom ulju proizvedenom iz nusproizvoda sjemenke palme tukume (*Astrocaryum vulgare* Mart.).

Dobiveni rezultati su također u skladu s istraživanjem Chuyen i sur. (2018) gdje je ukupan sadržaj karotenoida bolje sačuvan u prahu ulja kore ploda dinje *Gac* (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) proizvedenog pri nižim temperaturama sušenja. Pri višim temperaturama sušenja zbog pucanja površinskog sloja čestice praha može doći do degradacije i smanjenog sadržaja karotenoida (Corrêa-Filho i sur., 2019). Također, u istraživanju Freitas Santos i sur. (2021) veće zadržavanje karotenoida bilo je u prahu ulja dobivenog iz nusproizvoda sjemenke palme tukume (*Astrocaryum vulgare* Mart.) sušenog pri nižoj temperaturi sušenja (120 °C) u odnosu na prahove dobivene sušenjem pri visokoj temperaturi sušenja (180 °C).

Međutim, istraživanja Kha i sur. (2014) i Thumthanaruk i sur. (2021) su pokazala da su veći sadržaj  $\beta$ -karotena i likopena imali prahovi dobiveni sušenjem raspršivanjem ulja mesnate kore sjemenki *Gac* dinje (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) pri visokim temperaturama sušenja (160 i 180 °C). Također, rezultati istraživanja koje su proveli Freitas

Santos i sur. (2019) su pokazali veću stabilnost karotenoida (84,8-89,7 %) u prahu dobiven sušenjem pri visokoj ulaznoj temperaturi sušenja (180 °C) i većim omjerima ulja i nosača (5:95, 10:90, 20:80 i 30:70 %).

Rezultati istraživanja Carmona i sur. (2018) također su pokazali da je veći sadržaj  $\beta$ -karotena u prahovima dobivenim iz prešanog palminog ulja povećanjem temperature sušenja od 130 do 184 °C, dok je daljnjim povećanjem temperature (202 °C) došlo do smanjenog sadržaja inkapsuliranog  $\beta$ -karotena. Vjerojatno razlog tomu je što karotenoidi prisutni u palminom ulju zbog velikog broja konjugiranih dvostrukih veza u kemijskoj strukturi lako oksidiraju i izomeriziraju. Također, pri višim temperaturama sušenja može doći do oštećenja površine čestica praha što ubrzava otpuštanje sadržaja iz čestice te povećava propusnost plinova koji utječu na degradaciju biološki aktivnih spojeva ulja (Kha i sur. 2014). U istraživanju Carmona i sur. (2018) visok omjer ulja i nosača arapske gume (1:4) ima značajan utjecaj na inkapsulaciju  $\beta$ -karotena što se može objasniti većom viskoznosti emulzije koja skraćuje vrijeme formiranja polupropusne membrane oko kapljice čime se otežava difuzija ulja na površinu čestice koja se suši (Roccai i sur., 2014). Uz to, veća viskoznost emulzije može zaštititi biološki aktivne spojeve od toplinske razgradnje (Rajabi i sur., 2015).

Rezultati statističke analize pojedinačnog i kombiniranog utjecaja omjera ulja i nosača te temperature na maseni udio ukupnih karotenoida u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su u tablici 4. Prema rezultatima multifaktorske analize varijance (ANOVA) utvrđeno je da pojedinačni utjecaj omjera ulja i nosača te temperature je statistički značajno utjecao na maseni udio ukupnih karotenoida. Kod kombiniranog utjecaja najviši maseni udjeli ukupnih karotenoida u prahovima određeni su pri 120 °C, s omjerima ulja i nosača 1:2 i 1:3. Povećanjem temperature na 150 °C dolazi do značajnog pada masenih udjela karotenoida, dok daljnje povećanje temperature na 180 °C nije imalo značajan utjecaj. Pri omjeru ulja i nosača 1:4 nije zabilježen statistički značajan utjecaj temperature na maseni udio ukupnih karotenoida.



#### 4.3. UTJECAJ PARAMETARA SUŠENJA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET U PRAHOVIMA ULJA PULPE PASJEG TRNA

U ulju pulpe pasjeg trna (početni uzorak) te u prahovima proizvedenim procesom sušenja raspršivanjem određen je antioksidacijski kapacitet lipofilnom ORAC metodom.

Antioksidacijski kapacitet (AOK) početnog uzorka ulja pulpe pasjeg trna određen L-ORAC-om iznosio je 1279,472  $\mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  ulja. U prahovima proizvedenim sušenjem raspršivanjem ulja AOK je bio u rasponu od 623,47 do 1203,2  $\mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$  ulja (tablica 3). Sušenjem raspršivanjem vrijednosti AOK su se smanjile u prahovima u rasponu od 4,39-51,27 % u odnosu na početni uzorak ulja što je u skladu s uočenim smanjenjem masenih udjela  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida.

Najveće vrijednosti AOK određene su u uzorcima prahova osušenim pri 120 °C, s omjerom ulja i nosača 1:4 te u prahovima osušenim pri 150 °C, s omjerima 1:3 i 1:4. Općenito, pri vrlo visokim temperaturama (180 °C) sušenja smanjuje se vrijednost AOK. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Ferreira i sur. (2021) gdje su u uzorcima prahova proizvedenim sušenjem raspršivanjem ulja sjemenki palme tukume pri niskoj ulaznoj temperaturi (100 °C) i omjeru ulja i nosača (1:3) određene visoke vrijednosti AOK. Također, u istraživanju Chuyen i sur. (2018) sušenjem ulja kore ploda dinje Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) pri niskim ulaznim temperaturama sušenja i većem omjeru ulja i nosača određene su visoke vrijednosti AOK (82 % od AK početnog uzorka ulja). U oba istraživanja utvrđena je vrlo visoka korelacija između koncentracije karotenoida i AOK odnosno gubitkom karotenoida proporcionalno se smanjivao AOK praha. U istraživanju Guadarrama-Lezama i sur. (2012) sušenjem ekstrakata čilija (*Capsicum annuum* L.) određene su visoke vrijednosti AOK (76-80 %) pri višoj ulaznoj temperaturi (160 °C) te većem omjeru ulja i nosača (1:4). Korišteni ekstrakti su dobiveni primjenom ekstrakcije otapalom (kukuruznim, suncokretovim i šafranovim uljem) iz osušene papričice čilija.

Najniži AOK određen je u uzorku praha osušenim pri temperaturi 180 °C, s omjerom ulja i nosača 1:4. Isti trend prate rezultati istraživanja Ferreira i sur. (2016) gdje su niže vrijednosti AOK određene u prahu osušenog sirovog palminog ulja pri visokoj ulaznoj temperaturi sušenja od 180 °C te omjerom ulja i smjese nosača (škrob manioka, koncentrirani proteini sirutke i arapske gume) 1:4. Razlog tome može biti povećana vrijednost peroksida zbog većeg stupnja oksidacije ulja te smanjenog sadržaja antioksidanasa poput vitamina E

(Ramadan i sur., 2006). Tonon i sur. (2011) utvrdili su povećanje peroksidne vrijednosti ulja pri višim ulaznim temperaturama zraka za sušenje.

Prema istraživanju Selamat i sur. (2018) veći omjeri ulja i nosača značajno utječu na zadržavanje sadržaja tokoferola u prahu dobivenom sušenjem ulja, a time i na AOK. Simonne i Eitenmiller (1998) su uočili da u uljima s visokim udjelom zasićenih masnih kiselina dolazi do brže razgradnje tokoferola zbog veće podložnosti djelovanja kisika. Pored toga, nezasićene masne kiseline zajedno s tokoferolima su u kompeticiji kao supstrat za oksidaciju te je zbog toga smanjen gubitak AOK. Tokoferoli tvore stabilnije slobodne radikale gubitkom vodikovog atoma iz hidroksile skupine u odnosu na nezasićene masne kiseline. Time se brže oksidiraju te rezultiraju učinkovitijem antioksidacijskom potencijalu. Uz to, doprinose uspješnijoj stabilnosti ulja te zaustavljaju lančane reakcije kojima se povećava proizvodnja štetnih slobodnih radikala (Sundram i sur., 2003; Hoffmann, 1989).

Prema rezultatima multifaktorske analize varijance (ANOVA) utvrđeno je da je pojedinačni utjecaj omjera ulja i nosača te temperature statistički značajno utjecao na AOK prahova. Kod kombiniranog utjecaja, pri temperaturi od 120 °C dolazi do značajnog pada AOK povećanjem omjera ulja i nosača s 1:2 na 1:3, dok se AOK povećava kod omjera na 1:4. Pri temperaturi 150 °C povećanjem omjera s 1:2 na 1:3 dolazi do značajnog povećanja vrijednosti AOK, dok daljnje povećanje omjera na 1:4 nije imalo značajan utjecaj. Pri temperaturi 180 °C zabilježen je značajan utjecaj omjera ulja i nosača na smanjenje AOK.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Primjena procesa sušenja raspršivanjem ulja pulpe pasjeg trna pokazala se učinkovitom u proizvodnji inkapsulata s poželjnim masenim udjelima  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida te vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta.
2. Najveći maseni udjeli  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih karotenoida određeni su u uzorcima osušenim pri temperaturama 120 °C, s omjerom nosača i ulja 1:2.
3. Najveće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene su u uzorcima praha osušenim pri 120 °C, s omjerom ulja i nosača 1:4 te pri 150 °C, s omjerima ulja i nosača 1:3 i 1:4. Visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u prahovima su zbog prisutnosti  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida, ali i drugih biološki aktivnih spojeva koji nisu bili ispitivani u ovom radu.
4. Arapska guma kao nosač imala je značajan utjecaj na zadržavanje ispitivanih biološki aktivnih spojeva tijekom sušenja raspršivanjem zbog svojih pozitivnih svojstava poput emulgiranja i visoke oksidacijske stabilnosti.
5. Pri sušenju ulja pulpe pasjeg trna, veći omjer ulja i nosača utjecao je na smanjenje masenog udjela  $\alpha$ -tokoferola, te na povećanje masenog udjela ukupnih karotenoida i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.
6. Na temelju statističke analize, temperatura sušenja je značajno utjecala na maseni udio karotenoida i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, dok na maseni udio  $\alpha$ -tokoferola nije imala značajan utjecaj. Omjer ulja i nosača značajno je utjecao na masene udjele  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida te na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.
7. Optimalni uvjeti za proizvodnju praha s visokim masenim udjelima  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida te vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta sušenjem raspršivanjem ulja pulpe pasjeg trna su pri temperaturi sušenja od 120 °C i s omjerom ulja i nosača 1:2.

## 6. POPIS LITERATURE

Abubakar AR, Haque M (2020) Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci* **12(1)**, 1-12. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19).

Afoakwah A, Adomako C, Owusu J, Engman N, Hannah AA (2012) Spray drying as an appropriate technology for the food and pharmaceutical industries-a review. *J Env Sci Comput Sci Eng Technol* **1(3)**, 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>

Aghbashlo M, Mobli H, Madadlou A, Rafiee S (2012) Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Bioproc Tech* **6(6)**, 1561-1569. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0796-7>

Anandharamakrishnan C, Padma SI (2015) Spray drying techniques for food ingredient encapsulation, John Wiley & Sons, Oxford.

Andersson SC, Olsson ME, Johansson E, Rumpunen K (2009) Carotenoids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *J Agric Food Chem* **57(1)**, 250-258. <https://doi.org/10.1021/jf802599f>

Arpagaus C (2019) Production of food bioactive-loaded nanoparticles by nano spray drying. U: Jafari S (ured.) Nanoencapsulation of Food Ingredients by Specialized Equipment, 1. izd., Academic Press, London, str. 151-211.

Assadpour E, Jafari SM (2019) Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. *Annu Rev Food Sci Technol* **10**, 103-131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>

Aundhia CJ, Raval JA, Patel MM, Shah NV, Chauhan SP, Sailor GU i sur. (2011) Spray drying in the pharmaceutical industry—a review. *Indo Am J Pharm Res* **2(1)**, 125-138.

Banker GS, Rhodes CT (2002) Modern Pharmaceutics: Revised and Expanded, 4.izd., Marcel Dekker Inc., New York.

Beveridge T, Li TS, Oomah BD, Smith A (1999) Sea buckthorn products: Manufacture and composition. *J Agric Food Chem* **47**, 3480–3488. <https://doi.org/10.1021/jf981331m>

Carmona PAO, Garcia LC, de Aquino Ribeiro JA, Valadares LF, de Figueiredo Marçal A, de França LF, Mendonça S (2018) Effect of solids content and spray-drying operating conditions on the carotenoids microencapsulation from pressed palm fiber oil extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Bioproc Tech* **11(9)**, 1703-1718. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2132-3>

Castro-Puyana M, Pérez-Sánchez A, Valdés A, Ibrahim OHM, Suarez-Álvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ibáñez E, García-Cañas V (2017) Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res Int* **99**, 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021>

Cenkowski S, Yakimishen R, Przybylski R, Muir WE (2006) Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Can Biosyst Eng* **48**, 3.

Chang PS, Lee J, Lee JJJ (2005) Development of a new colorimetric method determining the yield of microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol. *J Agric Food Chem* **53(19)**, 7385-7389. <https://doi.org/10.1021/jf051015p>

Chemat F, Grondin I, Sing ASC, Smadja J (2004) Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason Sonochem* **11(1)**, 13-15. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00127-5).

Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M (2017) Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov Food Sci Emerg Technol* **41**, 357-377. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>

Chun J, Lee J, Ye L, Exler J, Eitenmiller RR (2006) Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J Food Compos Anal* **19**, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.08.001>

Chuyen HV, Roach PD, Golding JB, Parks SE, Nguyen MH (2019) Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. *Powder Technol* **344**, 373-379. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.12.012>

Ciesarová Z, Murkovic M, Cejpek K, Kreps F, Tobolková B, Koplík R, Belajova E, Kukurová K, Daško L, Panovská Z, Revenco D, Burčová Z (2020) Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) So exceptional? A review. *Int Food Res J* **133**, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>.

Coimbra PPS, Cardoso FSN, Andrade Gonçalves ÉCB (2020) Spray-drying wall materials: relationship with bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1786354>

Corrêa-Filho LC, Lourenço MM, Moldão-Martins M, Alves VD (2019) Microencapsulation of  $\beta$ -Carotene by spray drying: effect of wall material concentration and drying temperature. *Int J Food Sci* **2019**, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>

Cortés-Rojas DF, Oliveira WP (2012) Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. *Drying Tech* **30(9)**, 921-934. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.666608>

Davidson CD, Enns R, Gobin S (1994) Landscape plants at the Morden Arboretum. Agriculture & Agri-Food Canada, Morden, Manitoba, Canada, str. 163.

Di Battista CA, Constenla D, Ramírez-Rigo MV, Piña J (2015) The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technol* **286**, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>

Ding J, Ruan CJ, Guan Y, Shan JY, Li H, Bao YH (2016) Characterization and identification of ISSR markers associated with oil content in sea buckthorn berries. *Genet Mol Res* **15(3)**, gmr.15038278. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038278>

Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, Kostić I, Komes D, Bugarski B, Nedović V (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng Rev* **7**, 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2(2)**, 22-33.

- El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H i sur. (2015) Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm* **483(1-2)**, 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Elvira-Torales LI, García-Alonso J, Periago-Castón MJ (2019) Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. *Antioxidants* **8(7)**, 229. <https://doi.org/10.3390/antiox8070229>
- Fallon, A, Booth RFG, Bell LD (1990) Applications of HPLC in biochemistry. U: Burdon RH, Knippenberg PH (ured.) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Elsevier, Amsterdam/New York/Oxford, str. 8-21.
- Ferreira CD, da Conceição E JL, Machado BAS, Hermes VS, de Oliveira Rios A, Druzian JI, Nunes IL (2016) Physicochemical characterization and oxidative stability of microencapsulated crude palm oil by spray drying. *Food Bioproc Tech* **9(1)**, 124-136. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1603-z>
- Ferreira LMDMC, Pereira RR, Carvalho FBD, Silva Santos A, Ribeiro-Costa RM, Carréra Silva Júnior JO (2021) Green Extraction by Ultrasound, Microencapsulation by Spray Drying and Antioxidant Activity of the Tucuma Coproduct (*Astrocaryum vulgare* Mart.) Almonds. *Biomolecules* **11(4)**, 545. <https://doi.org/10.3390/biom11040545>
- Fitzpatrick JJ, Ahrné L (2005) Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. *Chem Eng Process: Process Intensif* **44(2)**, 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2004.03.014>
- Freitas Santos PD, Rubio FTV, de Carvalho Balieiro JC, Thomazini M, Favaro-Trindade CS (2021) Application of spray drying for production of microparticles containing the carotenoid-rich tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart.). *LWT*, **143**, 111106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111106>
- Freitas Santos PD, Gomes Quirino DJ, Thomazini M, Favaro-Trindade CS (2019) Spray drying microencapsulation of carotenoid-rich oil from tucumã pulp (*Astrocaryum vulgare* Mart.). „13<sup>th</sup> Latin American Symposium on Food Science”, Sao Paulo, vol. 4., 114501.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int* **40**, 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Grljić Lj (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2. izd., August Cesarec, Zagreb, str. 211-212.

Guadarrama-Lezama AY, Dorantes-Alvarez L, Jaramillo-Flores ME, Pérez-Alonso C, Niranjana K, Gutiérrez-López GF, Alamilla-Beltrán L (2012) Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *J Food Eng* **112(1-2)**, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.032>

Guan TT, Cenkowski S, Hydamaka A (2005) Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) leaves. *J Food Sci* **70(9)**, E514-E518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08312.x>

Guliyev VB, Gul M, Yildirim A (2004) *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *J Chromatogr B Biomed Appl* **812(1-2)**, 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.047>

Gupta C, Chawla P, Arora S, Tomar SK, Singh AK (2015) Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification. *Food Hydrocoll* **43**, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.021>

Handa SS (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants U: Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D., (ured.) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International Centre for Science and High Technology, Trst, str. 21-25.

Hoffmann (1989) The chemistry of edible fats. U: The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products, 1. izd., Academic Press, London, str. 1-28.

HRN EN ISO 9936:2007 Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje količine tokoferola i tokotrienola tekućinskom kromatografijom visokog učinka.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK (2002) Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *J Agric Food Chem* **50(7)**, 1815–1821. <https://doi.org/10.1021/jf0113732>



Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B (2008) Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Dry Technol* **26(7)**, 816-835. <https://doi.org/10.1080/07373930802135972>

Jafari SM, Mahdavi-Khazaei K, Hemmati-Kakhki A (2016) Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydr Polym* **140**, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.079>

Jastrzab A, Skrzydlewska E (2019) Composition and Biomedical Relevance of Sea buckthorn. *Acta Pol Pharm* **76(6)**, 959-969. <https://doi.org/10.32383/appdr/111181>

Kallio H, Yang B, Peippo P, Tahvonon R, Pan R (2002) Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *J Agric Food Chem* **50**, 3004–3009. <https://doi.org/10.1021/jf011556o>

Kha TC, Nguyen MH, Roach PD, Stathopoulos CE (2014) Microencapsulation of Gac oil: Optimisation of spray drying conditions using response surface methodology. *Powder Tech* **264**, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.053>

Khan BA, Akhtar N, Mahmood T (2010) A Comprehensive Review of a Magic Plant, *Hippophae rhamnoides*. *Pharmacogn J* **2(16)**, 65–68. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80053-7](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80053-7)

Konopka I, Roszkowska B, Czaplicki S, Tanska M (2016) Optimization of pumpkin oil recovery by using aqueous enzymatic extraction and comparison of the quality of the obtained oil with the quality of cold-pressed oil. *Food Technol Biotechnol* **54(4)**, 413–420. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4623>

Konuskan DB (2020) Minor bioactive lipids in cold pressed oils. U: Ramadan, M. F., (ured.) Cold Pressed Oils: Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Application, Academic Press, London, str. 7-14.

Krull I, Szul M (1997) Detection Sensitivity and Selectivity. U: Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (ured.) Practical HPLC method development, 2. izd., Wiley, New York., str. 77.

Kumar R, Phani Kumar G, Chaurasia OP, Singh SB (2011) Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review. *Res J Med Plant* **5**, 491-499. <http://dx.doi.org/10.3923/rjmp.2011.491.499>

Lachman J, Hejtmankova A, Orsak M, Popov M, Martinek P (2018) Tocotrienols and tocopherols in colored-grain wheat, tritordeum and barley. *Food Chem* **240**, 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.123>

Lee SH, Heng D, Ng WK, Chan H-K, Tan RBH (2011) Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int J Pharm* **403**, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.012>

León-Martínez FM, Mendez-Lagunas LL, Rodríguez-Ramírez J (2010) Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr Polym* **81(4)**, 864-870. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.061>

Leskinen HM, Suomela J-P, Yang B, Kallio HP (2010) Regioisomer Compositions of Vaccenic and Oleic Acid Containing Triacylglycerols in Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) Pulp Oils: Influence of Origin and Weather Conditions. *J Agr Food Chem* **58**, 537–545. <https://doi.org/10.1021/jf902679v>

Leuenberger H, Lanz M (2005) Pharmaceutical powder technology—from art to science: the challenge of the FDA's Process Analytical Technology initiative. *Ad. Powder Technol* **16**, 3-25. <https://doi.org/10.1163/1568552053166683>

Li TSC, Beveridge THJ (2003) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): Production and Utilization, NRC Research Press, Ottawa, str. 101-108.

Mandal SC, Mandal V, Das AK (2015) Classification of Extraction Methods. U: Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications, Academic Press, London, str. 84-136.

Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* **74(1)**, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>

Mar JM, da Silva LS, Lira AC, Kinupp VF, Yoshida MI, Moreira WP i sur. (2020) Bioactive compounds-rich powders: Influence of different carriers and drying techniques

on the chemical stability of the Hibiscus acetosella extract. *Powder Technol* **360**, 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.10.062>

Marsiñach MS, Cuenca AP (2019) The impact of sea buckthorn oil fatty acids on human health. *Lipids Health Dis* **18(1)**, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1065-9>

Mezzomo N, Ferreira SR (2016) Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *J Chem* **2016**, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>

Mohammed NK, Tan CP, Manap YA, Muhiadin BJ, Hussin ASM (2020) Spray drying for the encapsulation of oils – A review. *Molecules* **25 (17)**, 1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules25173873>

More Swati K, Wagh MP (2014) Review on Spray Drying Technology. *Int J Pharm Chem Biol Sci* **4(2)**, 219-225.

Murugesan R, Orsat V (2012) Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review. *Food Bioproc Tech* **5(1)**, 3-14. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0638-z>

Mwaurah PW, Kumar S, Kumar N, Attkan AK, Panghal A, Singh VK, Garg MK (2020) Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19(1)**, 3-20. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12507>

Naguib YMA, Hari SP, Passwater Jr. R, Huang D (2003) Antioxidant Activities of Natural Vitamin E Formulations. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**, 217.-220. <https://doi.org/10.3177/jnsv.49.217>

Nde DB, Foncha AC (2020) Optimization methods for the extraction of vegetable oils: A review. *Processes* **8(2)**, 209. <https://doi.org/10.3390/pr8020209>

Niki, E., Abe K. (2019) Vitamin E: Structure, Properties and Functions. U: Niki E (ured.) Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits, The Royal Society of Chemistry, London, str. 1-8.

Ogrodowska D, Tańska M, Brandt W, Czaplicki S (2019) The influence of emulsion drying on the fatty acid composition, bioactive compounds content and oxidative stability

of encapsulated bio-oils. *CyTA J Food* **17(1)**, 949-959. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1676316>

Ogrodowska D, Tanska M, Brandt W, Czaplicki S (2020) Impact of the encapsulation process by spray-and freeze-drying on the properties and composition of powders obtained from cold-pressed seed oils with various unsaturated fatty acids. *Polish J Food Nutr Sci* **70(3)**, 241-252. <https://doi.org/10.31883/pjfns/120314>

Olas B (2018) The beneficial health aspects of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) oil. *J Ethnopharmacol* **213**, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.022>

Özbek ZA, Ergönül PG (2017) A review on encapsulation of oils. *CBUJOS* **13(2)**, 293-309. <https://doi.org/10.18466/cbayarfb.313358>

Ozcan M, Al-Juhaimib FY, Ahmed IAM, Osman MA, Gassem MA (2019) Effect of different microwave power setting on quality of chia seed oil obtained in a cold press. *Food Chem* **278**, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.048>

Phisut N (2012) Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *Int Food Res J* **19**, 1297-1306.

Piñón-Balderrama CI, Leyva-Porras C, Terán-Figueroa Y, Espinosa-Solís V, ÁlvarezSalas C, Saavedra-Leos MZ (2020) Encapsulation of Active Ingredients in Food Industry by Spray-Drying and Nano Spray-Drying Technologies. *Processes* **8**, 889. <https://doi.org/10.3390/pr8080889>

Pop EA, Diaconeasa ZM, Fetea F, Bunea A, Dulf F, Pinteana A, Socaciu C (2015) Carotenoids, tocopherols and antioxidant activity of lipophilic extracts from sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides*), apricot pulp and apricot kernel (*Prunus Armeniaca*). *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Food Sci Technol* **72**, 169-176.

Pop RM, Weesepeel Y, Socaciu C, Pinteana A, Vincken JP, Gruppen H (2014) Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem* **147**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>

Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Func Foods* **18**, 797– 810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Pundir S, Garg P, Dwiwedi A, Ali A, Kapoor VK, Kapoor D i sur. (2020) Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review. *J Ethnopharmacol* **266**, 1-53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113434>

Rafalska A, Abramowicz K, Krauze M (2017) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a plant for universal application. *World Sci News*, **72**, 123-140.

Rajabi H, Ghorbani M, Jafari SM, Mahoonak AS, Rajabzadeh G (2015) Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food hydrocoll* **51**, 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.033>

Ramadan MF (2020) Introduction to cold pressed oils: Green technology, bioactive compounds, functionality, and applications. U: Ramadan MF (ured.) Cold Pressed Oils: Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Application, Academic Press, London, str. 1-5.

Ramadan MF, Amer MMA, Sulieman AERM (2006) Correlation between physicochemical analysis and radical-scavenging activity of vegetable oil blends as affected by frying of French fries. *Eur J Lipid Sci Technol* **108(8)**, 670-678. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600058>

Ranard KM, Kuchan MJ, Erdman JW Jr (2019)  $\alpha$ -Tocopherol, but not  $\gamma$ -tocopherol, attenuates the expression of selective tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced genes in primary human aortic cell lines. *Lipids* **54(5)**, 289–299. <https://doi.org/10.1002/lipd.12149>

Ranjith A, Kumar KS, Venugopalan VV, Arumughan C, Sawhney RC, Singh V (2006) Fatty acids, tocopherols, and carotenoids in pulp oil of three sea buckthorn species (*Hippophae rhamnoides*, *H. salicifolia*, and *H. tibetana*) grown in the Indian Himalayas. *J Am Oil Chem Soc* **83(4)**, 359-364.

Rascon MP, Beristain CI, Garcia HS, Salgado MA (2011) Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy

protein isolate as wall materials. *LWT* **44** (2), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>

Roccia P, Martínez ML, Llabot JM, Ribotta PD (2014) Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Tech* **254**, 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.01.044>

Rocha GA, Favaro-Trindade CS, Grosso CRF (2012) Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microencapsulates. *Food Bioprod Process* **90**, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>

Rodríguez-Huezo ME, Pedroza-Islas R, Prado-Barragán LA, Beristain CI, Vernon-Carter EJ (2004) Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *J Food Sci* **69**(7), 351-359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13641.x>

Rodriguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, Boronat A, Gomez-Gomez L, Hornero-Mendez D i sur. (2018) A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res* **70**, 62-93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

Rosenberg M, Kopelman IJ, Talmon Y (1990) Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J Agric Food Chem* **38**(5), 1288-1294. <https://doi.org/10.1021/jf00095a030>

Samantha SC, Bruna ASM, Adriana RM, Fabio B, Sandro AR, Aline RCA (2015) Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. *Afr J Food Sci* **9** (9), 462–470. <https://doi.org/10.5897/ajfs2015.1279>

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **8**(1), 1-10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>

Selamat SN, Mohamad SNH, Muhamad II, Khairuddin N, Lazim NAM (2018) Characterization of spray-dried palm oil vitamin E concentrate. *Arab J Sci Eng* **43**(11), 6165-6169. <https://doi.org/10.1007/s13369-018-3362-4>

Selvamuthukumaran M, Tranchant C, Shi J (2019) Spray Drying Concept, Application and Its Recent Advances in Food Processing U: Selvamuthukumaran. M (ured.) Handbook on Spray Drying Applications for Food Industries. CRC Press, Boca Raton/London/New York, str. 1-26.

Selvamuthukumaran M, Shi J (2017) Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety* **1(1)**, 61-81. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx004>

Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X (2006) Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J Food Eng* **76(4)**, 664-669.

Simonne AH, Eitenmiller RR (1998) Retention of vitamin E and added retinyl palmitate in selected vegetable oils during deep-fat frying and in fried breaded products. *J Agric Food Chem* **46(12)**, 5273-5277. <https://doi.org/10.1021/jf9802528>

Sundram K, Sambanthamurthi R, Tan YA (2003) Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* **12(3)**, 355-362.

Suryakumar G, Gupta A (2011) Medicinal and therapeutical potential of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Ethnopharm* **138(2)**, 268–278.

Tan ZJ, Yang ZZ, Yi YJ, Wang HY, Zhou WL, Li FF, Wang CY (2016) Extraction of oil from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) using enzyme-assisted three-phase partitioning. *Appl Biochem Biotechnol* **179(8)**, 1325–1335. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2068-x>

Tarigan JB, Kaban J, Zulmi R (2018) Microencapsulation of vitamin e from palm fatty acid distillate with galactomannan and gum acacia using spray drying method. U: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, vol. 309, No. 1., IOP Publishing, str. 012095.

Teleszko M, Wojdyło A, Rudzińska M, Oszmiański J, Golis T (2015) Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J Agric Food Chem* **63(16)**, 4120-4129. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00564>

Thumthanaruk B, Laohakunjit N, Chism GW (2021) Characterization of spray-dried Gac aril extract and estimated shelf life of  $\beta$ -carotene and lycopene. *PeerJ* **9**, e11134. <https://doi.org/10.7717/peerj.11134>

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends Analyt Chem* **71**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD (2011) Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Res Int* **44(1)**, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>

Vashishtha V, Barhwal K, Kumar A, Hota SK, Chaurasia OP, Kumar B (2017) Effect of seabuckthorn seed oil in reducing cardiovascular risk factors: A longitudinal controlled trial on hypertensive subjects. *Clin Nutr* **36(5)**, 1231-1238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.07.013>

Vinatoru M (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* **8(3)**, 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)

Watson DG (2005) High-pressure liquid chromatography. U: Pharmaceutical Analysis: A Textbook For Pharmacy Students And Pharmaceutical Chemists, Churchill Livingstone, Elsevier Limited, Edinburgh., str. 252.

Yang B, Kallio H (2002) Composition and physiological effects of sea buckthorn (Hippophae) lipids. *Trends Food Sci Technol* **13(5)**, 160-167. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00136-X)

Yara-Varón E, Li Y, Balcells M, Canela-Garayoa R, Fabiano-Tixier AS, Chemat F (2017) Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules* **22(9)**, 1-24.

Yue X.F, Shang X, Zhang ZJ, Zhang YN (2017) Phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oils from different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Food Drug Anal* **25(2)**, 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.010>



Zakynthinos G, Varzakas T (2015) Hippophae rhamnoides: safety and nutrition. *Curr Res Nutr Food Sci* **3(2)**, 89-97. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.2.01>

Zeb A (2006) Chemical and Nutritional constituents of sea Buckthorn juice. *Pak J Nutr* **3(2)**, 99-106. <http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2004.99.106>

Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G (2019). Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur J Pharm Sci* **127**, 300-318. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>

Zielińska A, Nowak I (2017) Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids Health Dis* **16(1)**, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0469-7>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Marina Dragičević

Vlastoručni potpis