

Bioraspoloživost inkapsuliranih ekstrakata koprive

Tomšić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:741878>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Antonija Tomšić

**BIORASPOLOŽIVOST
INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA
KOPRIVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivone Elez Garofulić te uz pomoć Ene Cegledi, mag. ing..



Ovaj rad izrađen je u okviru projekta “Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma” (PlantBioPower, IP-01-2018-4924) voditeljice prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac, financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Neizmjerno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu te uloženom vremenu i strpljenju. Veliko hvala mag. ing. Eni Cegledi na pomoći, prenesenom znanju, korisnim savjetima i dostupnosti u svakom trenutku izrade ovog rada.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima i sestri na pruženoj bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i vjeri u mene tijekom cijelog mog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

BIORASPOLOŽIVOST INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA KOPRIVE

Antonija Tomšić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058210247

Sažetak: Kopriva predstavlja bogat izvor fenolnih spojeva koje karakterizira niska bioraspoloživost nakon oralne primjene. Cilj rada bio je istražiti utjecaj inkapsulacije na bioraspoloživost ekstrakata koprive pomoću *in vitro* testa probave koji se sastojao od tri faze: gastične, apsorpcijske i intestinalne. Ekstrakti lista koprive inkapsulirani su tehnikom sušenja raspršivanjem, a razlikovali su se prema vrsti nosača te omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača. Koncentracija fenolnih spojeva određena je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Najviša koncentracija fenolnih spojeva izmjerena je u intestinalnoj, a najniža u apsorpcijskoj fazi. Nosač kombinacije β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2 omogućio je najveću apsorpciju fenolnih spojeva. Najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen je u gastičnoj, a najniži u apsorpcijskoj fazi. Kombinaciji maltodekstrina i arapske gume (75:25) pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3 određen je najviši antioksidacijski kapacitet. Inkapsulacijom se povećala bioraspoloživost fenolnih spojeva. Iz najboljeg inkapsuliranog uzorka apsorbiralo se 43,60 % fenolnih spojeva, a iz neinkapsuliranog ekstrakta 4,15 %.

Ključne riječi: *bioraspoloživost, sušenje raspršivanjem, in vitro probava, fenolni spojevi, kopriva*

Rad sadrži: 51 stranica, 11 slika, 5 tablica, 55 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. Ivona Elez Garofulić

Pomoć pri izradi: Ena Cegledi, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. doc. dr. sc. Maja Repajić (član)
4. doc. dr. sc. Zoran Zorić (zamjenski član)

Datum obrane: 04. srpnja 2022.

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
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

BIOAVAILABILITY OF ENCAPSULATED NETTLE EXTRACTS

*Antonija Tomšić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058210247*

Abstract: Nettle is a rich source of phenolic compounds characterized by low bioavailability after oral administration. The aim of this study was to investigate the effect of encapsulation on the bioavailability of nettle extracts using an *in vitro* digestion test consisting of three phases: gastric, absorption and intestinal. Nettle leaf extracts were encapsulated by the spray-drying technique and differed according to the type of carrier and the ratio of extract dry matter and the carrier. The concentration of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity by the FRAP method. The highest concentration of phenolic compounds was determined in the intestinal and the lowest in the absorption phase. The carrier combination of β -cyclodextrin and gum arabic (75:25) at extract dry matter and carrier ratio 1:2 allowed the highest absorption of phenolic compounds. The highest antioxidant capacity was noted in the gastric and the lowest in the absorption phase. The combination of maltodextrin and gum arabic (75:25) at extract dry matter and carrier ratio 1:3 enabled the highest antioxidant capacity. Encapsulation increased the bioavailability of phenolic compounds. 43.60 % of phenolic compounds were absorbed from the best encapsulated sample compared to 4.15 % from non-encapsulated extract.

Keywords: *bioavailability, spray-drying, in vitro digestion, phenolic compounds, nettle*

Thesis contains: 51 pages, 11 figures, 5 tables, 55 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: Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Ena Cegledi, mag. ing.

Reviewers:

1. Verica, Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Ivona, Elez Garofulić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Maja, Repajić, PhD, Assistant professor (member)
4. Zoran, Zorić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 04th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. OPĆENITO O KOPRIVI.....	2
2.2. EKSTRAKT KOPRIVE	3
2.2.1. Fenolni spojevi	5
2.2.2. Karotenoidi.....	6
2.2.3. Klorofili	7
2.3. INKAPSULACIJA	8
2.3.1. Odabir nosača.....	9
2.3.2. Inkapsulacijske tehnike	10
2.3.3. Sušenje raspršivanjem	11
2.4. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA	12
2.4.1. Fenolni spojevi u gastrointestinalnom traktu	13
2.4.2. <i>In vitro</i> modeli probave	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorak	17
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Aparatura.....	20
3.1.4. Pribor	20
3.2. METODE	21
3.2.1. Priprema početnog uzorka inkapsuliranog ekstrakta lista koprive	21
3.2.2. Određivanje bioraspoloživosti.....	21
3.2.2.1. Gastrična faza	21
3.2.2.2. Apsorbirana faza.....	21
3.2.2.3. Intestinalna faza.....	22
3.2.3. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom.....	22
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	24
3.2.5. Obrada podataka.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE.....	28
4.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE.....	35
4.3. BIORASPOLOŽIVOST INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE.....	40
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Novija istraživanja u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji usmjerena su na ekstrakciju i inkapsulaciju bioaktivnih spojeva iz hrane. Jedna od najzastupljenijih skupina su fenolni spojevi. Oni posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antioksidativno, protuupalno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Međutim, većina bioaktivnih spojeva slabo je topljiva u vodi, posjeduju neugodan okus i miris, općenito su nestabilni te se lako razgrađuju uobičajenim postupcima procesiranja i skladištenja.

Tehnologijom inkapsulacije bioaktivne komponente mogu se učinkovito integrirati u kapsule koje otpuštaju sadržaj pod posebnim uvjetima pa se zbog toga ova tehnologija vrlo često koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. U prehrambenoj industriji inkapsuliraju se bioaktivni spojevi (npr. antioksidansi, minerali, vitamini, fitosteroli, masne kiseline, likopen i dr.) i mikroorganizmi (npr. probiotici) (Vinceković i sur., 2017). Postoji niz tehnika za inkapsuliranje bioaktivnih spojeva, a neke od njih su: sušenje raspršivanjem, koacervacija, kokristalizacija, emulzifikacija, sušenje zamrzavanjem te liposomska inkapsulacija. Sušenje raspršivanjem jedna je od najstarijih i najraširenijih inkapsulacijskih tehnika u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Nedović i sur., 2011).

Biodostupnost, a posljedično i bioraspoloživost fenolnih spojeva značajno ovisi o strukturi i obliku u kojem se unose u organizam, interakcijama s drugim makromolekulama u hrani te modifikacijama tijekom probave. Simulirana gastrointestinalna probava jedan je od najčešće korištenih *in vitro* testova za procjenu biodostupnosti i bioraspoloživosti fenolnih spojeva (Grgić i sur., 2020).

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj inkapsulacije na bioraspoloživost fenolnih spojeva iz inkapsuliranih ekstrakata listova koprive (lat. *Urtica dioica* L.). Ekstrakt lista koprive inkapsuliran je tehnikom sušenja raspršivanjem, a uzorci su se razlikovali prema vrsti nosača te omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača. Za određivanje bioraspoloživosti fenolnih spojeva korišten je *in vitro* test koji se sastojao od tri faze: gastrične, apsorpcijske i intestinalne. Nakon svake faze probave određen je sadržaj fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OPĆENITO O KOPRIVI

Kopriva (lat. *Urtica dioica* L.) je višegodišnja biljka iz porodice koprivnjača (lat. *Urticaceae*). Naziv roda *Urtica* potječe od latinske riječi *urere* što znači žariti, dok ime vrste *dioica* označava dvodomnost - odvojenost muških i ženskih cvjetova na zasebnim biljkama (Upton, 2013).

Stabljika koprive je uspravna, ne razgranjena, visine do 150 cm. Tamnozeleni listovi srcolikog oblika s nazubljenim krajevima smješteni su jedan nasuprot drugoga na sabljici, a na naličju svježih listova jasno su izražene žilice (slika 1). Listovi i stabljika prekriveni su sitnim uspravnim dlačicama čiji tekući sadržaj u kontaktu s kožom uzrokuje lokalnu iritaciju popraćenu crvenilom i peckanjem koja može trajati i do 12 sati. Najznačajnije komponente iritirajuće tekućine su: acetilkolin, mravlja kiselina, 5-hidroksitriptamin (serotonin) i histamin. Kopriva cvjeta od svibnja do rujna sitnim zelenim cvjetovima skupljenim u guste viseće cvatove koji rastu ispod pazuha gornjih listova stabljike. Plod koprive, zeleni oraščić plosnatog oblika, sadrži jednu smeđu sjemenku. Podanak je blago razgranjen, kratak, smeđe boje, debljine 5-10 mm ovisno o vrsti. Razmnožavanje se odvija pomoću sjemenki i podanaka (Sliepčević, 2020; Upton, 2013; Asgarpanah i Mohajerani, 2012).



Slika 1. Kopriva (lat. *Urtica dioica* L.) (Asgarpanah i Mohajerani, 2012)

Kopriva je uglavnom samonikla biljka koja raste u područjima blage do umjerene klime, na otvorenim ili polusjenovitim mjestima bogatim nutrijentima i visoke vlažnosti. Najčešće su to

šume, područja uz rijeke i potoke te područja uz rub ceste. Široko je rasprostranjena u Europi, Aziji, Americi i dijelu Afrike (Repajić i sur., 2021). U manjoj mjeri kopriva se i kultivira. Najveći proizvođači kultivirane koprive su: bivše države Sovjetskog Saveza i Jugoslavije, Mađarska, Bugarska, Albanija i Njemačka (Upton, 2013).

Vrijeme berbe koprive ovisi o vrsti konačnog proizvoda. Ukoliko se kopriva koristi u proizvodnji svježih proizvoda i sokova berba se preporuča u proljeće ili rano ljeto prije cvjetanja dok se za proizvodnju sušenih proizvoda preporuča u vremenskom periodu od sredine proljeća do kraja ljeta. Osim toga, berba se preporuča u područjima koja nisu industrijski zagađena (Paulauskienė i sur., 2021; Upton, 2013).

Listovi i stabljika koprive najčešće se konzumiraju u obliku salate, čaja ili variva. Ekstrakcijom klorofila iz koprive dobiva se komercijalno zeleno bojilo E140 (Repajić i sur., 2021). U novije vrijeme, kopriva se sve više koristi u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao sirovina za proizvodnju vrijednih lijekova, dodataka prehrani i proizvoda za njegu kose i kože. Proizvodi na bazi koprive mogu se sigurno koristiti gotovo bez ikakvih nuspojava što ne vrijedi i za sintetičke lijekove i proizvode koji su danas prisutni na tržištu (Đurović i sur., 2017).

2. 2. EKSTRAKT KOPRIVE

Biljke se u tradicionalnoj medicini koriste već tisućljećima. Njihovo terapijsko djelovanje pripisuje se bioaktivnim komponentama kao što su terpenoidi, alkaloidi, flavonoidi, fenolni spojevi i brojni drugi spojevi. Bioaktivne komponente prisutne u biljkama obično nisu lako dostupne pa je zbog toga potrebno provesti proces ekstrakcije i pročišćavanja. Izolirane bioaktivne komponente mogu se koristiti u medicini (u liječenju karcinoma, dijabetesa, dermatoloških poremećaja i dr.), agrikulturi (repelentno djelovanje), kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Biljke su bogate vodom, šećerima, vlaknima te brojnim fitonutrijentima i vitaminima koji su bitni za održavanje homeostaze organizma. Redovitom konzumacijom biljnih ekstrakata postiže se antikancerogeno, antiinflamatorno, antioksidacijsko, antimikrobno i hepatoprotektivno djelovanje (Veiga i sur., 2020).

Brojne prednosti koprive prepoznate su već u antičkim vremenima te se zbog toga kopriva stoljećima upotrebljava u prehrani ljudi, tradicionalnoj medicini i kozmetici. Razvojem tehnologije i znanstvenim utvrđivanjem dobrobiti ljekovitih biljaka na ljudski organizam, porasla je potražnja proizvoda koji sadrže ekstrakte ljekovitih biljaka pa samim time i proizvoda na bazi ekstrakta koprive (Repajić i sur., 2020).

Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako gotovo svaki dio koprive posjeduje značajnu koncentraciju bioaktivnih komponenti koje djeluju protuupalno, antimikrobno, antioksidacijski, antikancerogeno, terapijski i analgetski. Kopriva se primarno preporučuje kao pomoćno sredstvo u liječenju reumatskih bolesti te za stimulaciju cirkulacije. Ekstrakt nadzemnih dijelova vrlo se često koristi u liječenju artritisa, anemije, alergija, dijabetesa, hipertenzije, oboljenja urinarnog trakta te za jačanje kose. Osim toga, posjeduje i diuretski učinak. S druge strane, ekstrakt podzemnog dijela koprive najčešće se koristi u liječenju benigne hiperplazije prostate (Karg i sur., 2021; Repajić i sur., 2020; Dhouibi i sur., 2019; Đurović i sur., 2017; Upton, 2013; Asgarpanah i Mohajerani, 2012; Otles i Yalcin, 2012). Bourgeois i sur. (2016) proveli su istraživanje u kojem su dokazali kako antioksidacijski kapacitet ekstrakta koprive doprinosi inhibiciji enzima odgovornih za starenje kože, točnije kolagenaze i elastaze. Najveći inhibitorski učinak iz ekstrakta koprive postigli su kvercetin i ursolična kiselina.

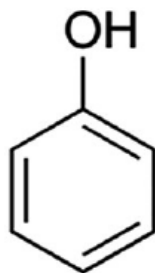
Kopriva se smatra visokovrijednom ljekovitom biljkom zbog bogatog kemijskog sastava. Iz ekstrakta listova koprive identificirani su: masne kiseline (palmitinska, *cis*-9,12 linolna i α -linolenska kiselina), terpenoidi, karotenoidi, klorofil, polifenolni spojevi, esencijalne aminokiseline, tanini, polisaharidi, steroli te minerali (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn). Kopriva obiluje vitaminima topljivima u vodi (C i B skupine) i vitaminima topljivima u mastima (A, D, E i K) (Paulauskienė i sur., 2021; Đurović i sur., 2017; Asgarpanah i Mohajerani, 2012). Repajić i sur. (2021) navode kako listovi koprive akumuliraju veće količine fenolnih spojeva i klorofila u usporedbi sa stabljikom te su općenito bogatiji biološki aktivnim molekulama. Stoga se lišće koprive najviše prerađuje i koristi u suvremenoj prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Također navode kako treba uzeti u obzir da se kemijski sastav mijenja starenjem biljke pa tako na primjer koncentracija fenolnih spojeva opada rastom i starenjem. Korijen koprive sadrži: fitosterole, polisaharide, lignane, flavonoide, protein lecitin, minerale i elemente u tragovima (Paulauskienė i sur., 2021; Repajić i sur., 2021).

Prema Repajić i sur. (2020) bioaktivne molekule koje doprinose biološkoj vrijednosti koprive su: polifenolni spojevi (hidroksicimetne kiseline i flavonoidi), klorofil *a* i *b*, karotenoidi te njihovi derivati. Biljka proizvodi biološki aktivne molekule kako bi omogućila važne fiziološke procese kao što su privlačenja oprašivača, uspostavljanja simbioze, osiguravanja strukturnih komponenti lignificiranim staničnim stijenkama vaskularnog tkiva te kao odgovor na različite oblike stresa. Na udio bioaktivnih molekula u koprivi značajno utječe klima pa je tako dokazano da koprive ubrane u kontinentalnom području sadrže više koncentracije fenolnih

spojeva, dok koprive ubrane u primorskom području imaju više koncentracije pigmenta (Repajić i sur., 2021).

2.2.1. Fenolni spojevi

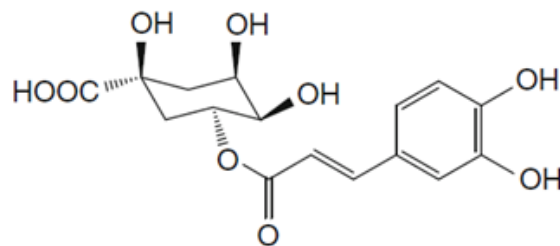
Fenolni spojevi ubrajaju se u sekundarne biljne metabolite. Prisutni su u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Najznačajniji izvori su žitarice, mahunarke, bobičasto voće, orašasti plodovi te njihovi proizvodi (sokovi od bobičastog voća, čajevi, vino i sl.). Općenito gledajući, udio fenolnih spojeva u sirovoj biljnoj hrani je veći u odnosu na procesiranu (fermentiranu, kuhanu, pasteriziranu i dr.) (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). S kemijskog stajališta, fenolni spojevi su aromatski organski spojevi s jednom ili više hidroksilnih skupina vezanih izravno na benzenski prsten (slika 2). Najzastupljeniji biljnih fenolni spojevi su: fenolne kiseline, flavonoidi, lignani, tanini, stilbeni, kinoni i lignini. Fenolni spojevi štite biljke od patogenih infekcija, biljojeda, UV zračenja, niskih temperatura i nedostatka nutrijenata. Osim toga, sudjeluju u hormonskoj regulaciji, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji, okusu i mirisu biljke (Lattanzio, 2013). Na fenolni sastav biljke utječu mnogi faktori, a neki od njih su: klimatski uvjeti, genotip, vrsta tla, vegetacijski stadij biljke i vrijeme berbe (Paulauskienė i sur., 2021). Ovi spojevi posjeduju snažna antioksidacijska, protuupalna, antikancerogena, antimikrobna i antiviralna svojstva (Đurović i sur., 2017). Unatoč tome, ukoliko se u organizam unese prevelika doza fenolnih spojeva mogu se manifestirati negativni učinci. Neki od njih su hemolitička anemija te upalni procesi jetre popraćeni temperaturom. Čajevi s visokom koncentracijom fenolnih spojeva, osobito tanina, mogu potaknuti reakciju keliranja željeza što dovodi do anemije (Tarko i sur., 2013).



Slika 2. Struktura fenolnog spoja (Veiga i sur., 2020)

Najznačajniji fenolni spojevi koprive su: klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, cikorijeva kiselina, kvercetin-3-glukozid, kaempferol-3-rutinozid i luteolin. Fenolni spoj s najvećom koncentracijom u ekstraktu koprive je klorogenska kiselina (slika 3)

(Repajić i sur., 2020). U istraživanju Otles i Yalcin (2012) analiziran je fenolni sastav koprive ubrane na različitim područjima. U ekstraktu listova koprive ubrane na području Mediterana identificirani su: miricetin, kvercetin, rutin, elaginska kiselina, kafeinska kiselina i klorogenska kiselina. U podanku koprive identificirani su: miricetin, rutin, elaginska kiselina, naringin i ferulinska kiselina dok su u stabljici identificirani: miricetin, ferulinska kiselina, naringin i isorhamnetin. Općenito gledajući, najviša koncentracija fenolnih spojeva određena je u listovima koprive, a najniža u stabljici. Isto tako, istraživači su dokazali da svježa kopriva sadrži višu koncentraciju fenolnih spojeva u odnosu na sušenu.

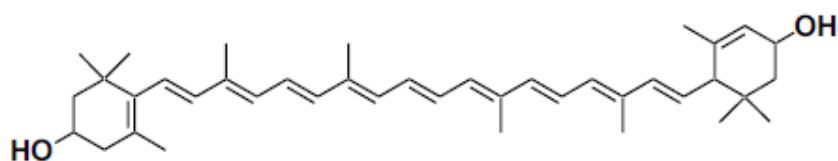


Slika 3. Struktura klorogenske kiseline (Lattanzio, 2013)

2.2.2. Karotenoidi

Karotenoidi su tetraterpenski pigmenti žute, narančaste, crvene i ljubičaste boje. Pronađeni su u fotosintetskim bakterijama, određenim vrstama arheja i gljiva, algama, biljkama i životinjama. Do danas identificirano je oko 850 različitih vrsta karotenoida. Mogu se podijeliti u dvije grupe, točnije na karotene i ksantofile. Najpoznatiji karoteni su: α -karoten, β -karoten, γ -karoten i likopen. U ksantofile ubrajaju se: lutein, zeaksantin, astaksantin, fukoksantin, peridinin i dr. Zajedno s klorofilom predstavljaju esencijalne pigmente u fotosintetskim organima. Karotenoidi sudjeluju u fotosintetskim reakcijama na način da prikupljaju sunčevu energiju te ju transportiraju do klorofila. Osim toga, u biljkama svojom bojom privlače oprašivače, prekursori su biljnih hormona te posjeduju antioksidacijska svojstva. Biljke, alge, gljive i fotosintetske bakterije mogu same sintetizirati karotenoide dok životinje nemaju tu sposobnost. One karotenoide uglavnom unose hranom. U životinjskom organizmu jačaju imunološki i reproduktivni sustav te su snažan antioksidans (Maoka, 2019). U ljudskom organizmu također posjeduju značajna antioksidacijska svojstva koja štite stanice od oštećenja te mogućeg razvoja određenih oblika karcinoma. Isto tako, posjeduju protuupalna svojstva te su prekursori vitamina A, esencijalnog za rast i razvoj (Đurović i sur., 2017).

Najdominantniji karotenoid u koprivi je lutein (slika 4), a osim njega identificirani su još: violaksantin i njegov derivat, neoksantin i njegov derivat, zeaksantin, 13'-*cis*-lutein, lutein 5,6-epoksid, 9'-*cis*-lutein, α -karoten, β -karoten i derivat likopena (Repajić i sur., 2020). Najviše koncentracije karotenoida nalaze se u listovima koprive kako bi se umanjila mogućnost degradacije klorofila. Naime, karotenoidi štite klorofil od degradacije na način da umanjuju oštećenja nastala fotokemijskim reakcijama koje uključuju kisik. Osim toga, više koncentracije karotenoida i klorofila identificirane su u uzorcima mladih kopriva ubranih na sjenovitim mjestima (Paulauskienė i sur., 2021).



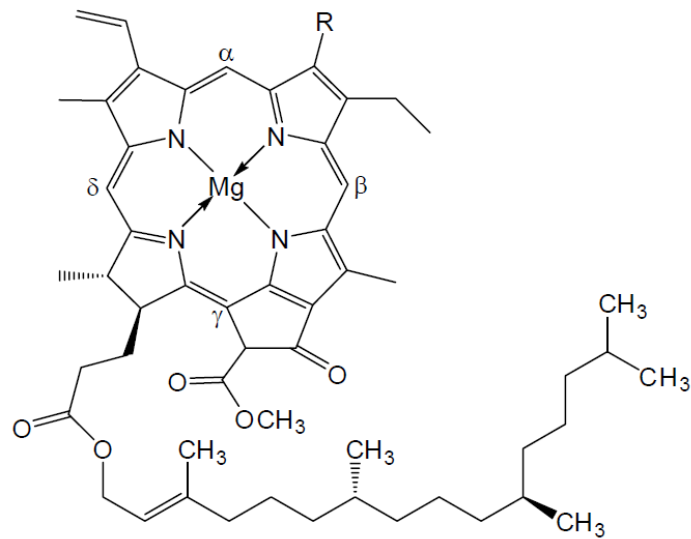
Slika 4. Struktura luteina (Maoka, 2019)

2.2.3. Klorofili

Fotosinteza, kemijska reakcija u kojoj se svjetlosna energija pretvara u kemijsku, odvija se u posebnim organelima zvanima kloroplasti. Kloroplasti posjeduju vanjsku i unutrašnju membranu, a između njih nalazi se međumembranski prostor. Unutrašnja membrana okružuje prostor zvan stroma. U tom prostoru nalaze se membranske strukture tilakoidi. Tilakoidne membrane sadržavaju sustave za pretvorbu energije: proteine za prikupljanje svjetla, reakcijske centre, lance za prijenos elektrona i ATP-sintazu. Ključni događaj u fotosintezi je prikupljanje svjetlosne energije, a to čine klorofili. Postoji nekoliko vrsta klorofila: klorofil *a*, *b*, *c*, *d* i *e*. Klorofil *a* glavni je fotoreceptor u kloroplastima većine zelenih biljaka. S obzirom na kemijsku strukturu, predstavlja ciklički tetrapireol s magnezijevim ionom u središtu (slika 5). Učinkovito apsorbira svjetlo valnih duljina 430 i 662 nm. Molekule klorofil *b* i karotenoidi također su važne za prikupljanje sunčeve svjetlosti. Klorofil *b* razlikuje se od klorofila *a* po tome što sadržava na mjestu metilne formilnu skupinu. Zbog te razlike klorofil *b* učinkovito apsorbira svjetlo valnih duljina 453 i 642 nm (Berg i sur., 2013).

Pigment klorofil je zajedno sa karotenoidima odgovoran za boju koprive. Najzastupljeniji pigment u koprivi je klorofil, točnije klorofil *a*. Osim njega identificirani su i klorofil *b* te šest njihovih derivata. Listovi predstavljaju glavne fotosintetske organe biljke. U skladu s tom činjenicom, u ekstraktu listova koprive identificirana je najviša koncentracija klorofila. S

obzirom na fenološki stadij biljke, najviša koncentracija pigmenata s dominacijom klorofila zabilježena je u fazi cvjetanja (Repajić i sur., 2021).



Slika 5. Struktura klorofila *a* ($R = \text{CH}_3$) i klorofila *b* ($R = \text{CHO}$) (Kaewsuksaeng, 2011)

2.3. INKAPSULACIJA

Inkapsulacija je tehnologija kojom se čvrsti, tekući ili plinoviti materijali pakiraju u male zapečaćene kapsule koje oslobađaju sadržaj pod posebnim uvjetima (Fang i Bhandari, 2010). Može se definirati i kao proces zarobljavanja jedne tvari unutar druge. Tvar koja se inkapsulira naziva se još aktivni sastojak, punjenje, unutarnja faza, jezgra ili nošena faza, dok se tvar kojom se provodi inkapsulacija naziva nosač, ljuska, membrana, vanjska faza, kapsula ili matriks. Promjer kapsula uglavnom se kreće između 10 nm i 10 μm (Vinceković i sur., 2017; Ray i sur., 2016; Nedović i sur., 2011).

U posljednjih nekoliko godina tehnologija inkapsulacije privukla je značajnu pažnju prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. U prehrambenoj industriji često se inkapsuliraju biološki aktivni spojevi (npr. antioksidansi, minerali, vitamini, fitosteroli, masne kiseline, likopen i dr.) i mikroorganizmi (npr. probiotici). Ove komponente vrlo su osjetljive na uvjete iz okoline, procesiranje, skladištenje i/ili na uvjete u gastrointestinalnom traktu. Inkapsulacijom postiže se učinkovita zaštita funkcionalnih komponenti hrane na način da se povećava njihova stabilnost tijekom procesiranja i skladištenja, sprječavaju se nepoželjne reakcije s drugim komponentama hrane, usporavaju se procesi degradacije (oksidacija, hidroliza i dr.) ili se sprječava razgradnja dok se komponenta ne dostavi na željeno mjesto.

Osim toga, ovom tehnologijom mogu se maskirati nepoželjni okusi i mirisi te se povećati bioraspoloživost inkapsulirane tvari (Nedović i sur., 2011). Inkapsulacija je osobito pogodna za pakiranje visoko vrijednih sastojaka ekstrahiranih iz voća, povrća ili otpada prehrambene industrije. Ova interdisciplinarna tehnologija zahtjeva poznavanje kemije, znanosti materijala, koloidnih sustava te fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava tvari koje se inkapsuliraju (Vinceković i sur., 2017).

Uz to, Delfanian i Ali Sahari (2020) predložili su dodatak inkapsuliranih fenolnih spojeva u mliječne i mesne proizvode, peciva, konditorske proizvode, sokove, energetska pića, tjesteninu, žvakače gume i bombone. Ovisno o recepturi funkcionalnog proizvoda, inkapsulirani fenolni spojevi mogu se dodavati u obliku krutine, polukrutine ili tekućine. Kako ne bi došlo do degradacije fenolnih spojeva potrebno je tijekom procesa proizvodne voditi računa o uvjetima miješanja, zagrijavanja, hlađenja, zamrzavanja, dehidratacije i sl. Nadalje, istraživači su naveli kako dodatak inkapsuliranih fenolnih spojeva može poboljšati reološka i senzorska svojstva, biorazgradivost i funkcionalnost proizvoda te produžiti rok valjanosti.

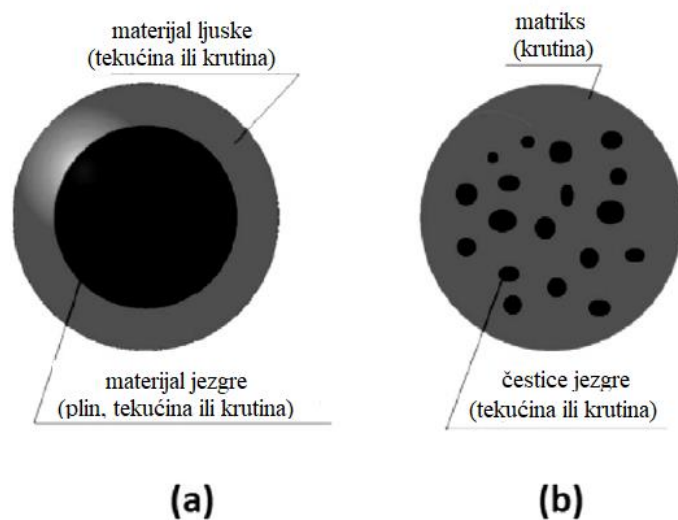
2.3.1. Odabir nosača

Faktori koje treba razmotriti prilikom odabira odgovarajuće vanjske faze su: način inkapsulacije, željena funkcionalnost kapsule, brzina otpuštanja aktivne tvari, ograničenja kemijskih reakcija između aktivne tvari i komponenata hrane tijekom procesiranja i skladištenja te cijena nosača. Nosači u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji moraju posjedovati GRAS (eng. *Generally Recognized as Safe*) status, tj. moraju biti općenito priznati da su sigurni za ljudsku konzumaciju. Od njih se također očekuje da budu: inertni, bez okusa, stabilni, ne higroskopni, srednje viskoznosti, topljivi u vodenom mediju ili odgovarajućem otapalu, biorazgradivi, ekonomični te moraju moći tvoriti film i lako se identificirati. Osim toga, moraju zadovoljiti barem jedno od sljedećih svojstava: fleksibilnost, lomljivost, tvrdoća ili mekoća. Najčešći nosači u prehrambenoj industriji su ugljikohidrati, proteini i lipidi. Od polimernih ugljikohidrata najčešće se koriste: kitozan, gume (agar, alginati, karagenan, guma arabika, pektin i dr.), škrob i njegovi proizvodi (maltodekstrin, dekstrin, modificirani i rezistentni škrob). Najčešći izvori proteinskih nosača su: proteini jajeta, mlijeka, soje i pšenice, zein te hidrolizirani proteini. Lipidni nosači proizvode se iz: glikolipida, mono- i di-glicerida, prirodnih masti i ulja, fosfolipida, voskova (pčelinji vosak i karnauba vosak) te frakcioniranih masti. Mehanizam otpuštanja aktivne tvari s nosača primarno ovisi o njihovim karakteristikama. Mehanizmi kojima se aktivna tvar može otpustiti s nosača su: difuzija, otapanje, erozija,

digestija te otpuštanje izazvano promjenom temperature, pH, tlaka ili ionskog naboja. U složenim sustavima najčešće se kombinira više navedenih mehanizama (Vinceković i sur., 2017; Nedović i sur., 2011).

2.3.2. Inkapsulacijske tehnike

Postupak inkapsulacije može se provesti na dva osnovna načina pri čemu se dobiva spremišni ili matriksni sustav. U spremišnom sustavu ljuska obavija kontinuiranu fazu jezgre dok je u matriksnom sustavu jezgra jednoliko raspoređena unutar čvrste faze matriksa (slika 6) (Vinceković i sur., 2017).



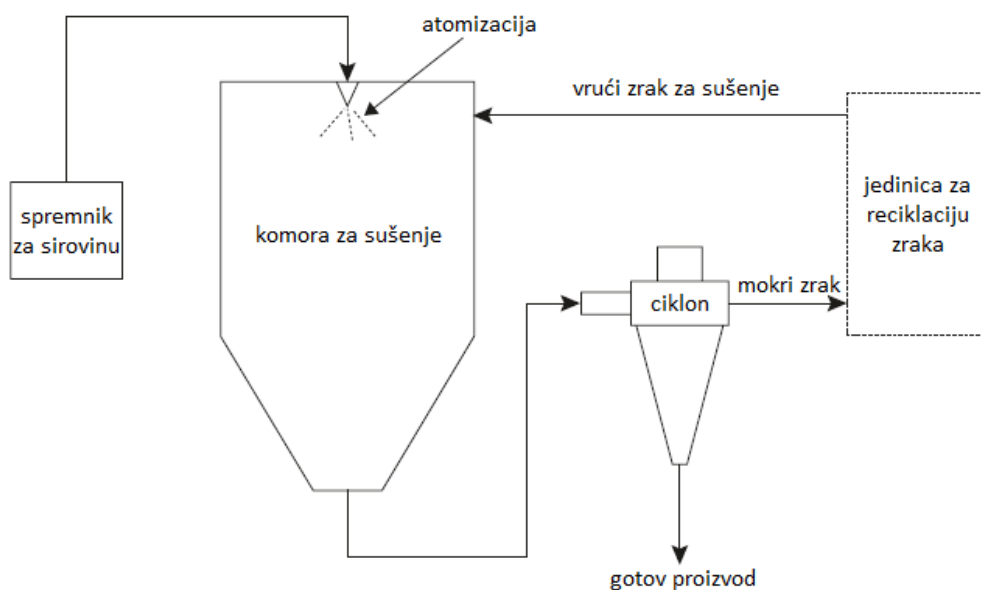
Slika 6. Spremišni (a) i matriksni (b) sustav inkapsulacije (*prema* Vinceković i sur., 2017)

Stvaranje kapsule može se postići na više načina: fizikalno-kemijskim procesima, mehaničkim metodama ili kemijskim procesima. U fizikalno-kemijske procese ubrajaju se: jednostavna ili složena koacervacija, ionska gelacija, emulzifikacija, liposomska inkapsulacija te evaporacija/ekstrakcija otapala. Mehaničke metode čine: sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, ekstruzijska sferonizacija, centrifugalna ekstruzija te procesi pomoću superkritičnih fluida. Konačno, inkapsulacija kemijskim procesima može se provesti: interfacijalnom polikondenzacijom, polimerizacijom te unakrsnim povezivanjem. Proces inkapsulacije može se podijeliti na tri osnovna koraka. Prvi korak uključuje inkorporaciju aktivne tvari u matriks miješanjem, sušenjem, mljevenjem, disperzijom i/ili prosijavanjem. U drugom koraku sustav se mehanički obrađuje kao bi se mogao provesti proces disperzije ili

aglomeracije. U posljednjem koraku provodi se stabilizacija čestica/kapljica te taloženje sloja prevlake kemijskim (polimerizacija), fizikalno-kemijskim (gelacija, koacervacija) ili fizičkim procesima (sušenje, skrućivanje). Odabrana metoda inkapsulacije mora posjedovati karakteristike kao što su: visoka učinkovitost procesa, otpuštanje aktivne tvari željenom brzinom, stvaranje homogenog proizvoda, jednostavnost te ekonomičnost procesa. Najčešće korištene metode inkapsulacije u prehrambenoj industriji su: sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, ekstruzija, emulzifikacija, kristalizacija, koacervacija te inkapsulacija liposomima (Vinceković i sur., 2017).

2.3.3. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem najstarija je i najraširenija tehnika inkapsulacije bioaktivnih komponenti u prehrambenoj industriji (Ray i sur., 2016). Materijal u tekućem obliku (emulzije, otopine, disperzije) prevodi se u prah raspršivanjem u vrućem zraku pri čemu dolazi do dehidracije. Ova tehnologija vrlo je jednostavna, brza, učinkovita i prilagodljiva za različite procese pa se zbog toga široko rasprostranila u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Piñón-Balderrama i sur., 2020). Osim toga, vrlo je ekonomična. U usporedbi s tehnologijom sušenja zamrzavanjem troškovi su niži za 8 puta, dok u odnosu na sušenje u vakuumu niži za 4 puta (Shishir i Chen, 2017).



Slika 7. Shematski prikaz sušenja raspršivanjem (prema Miller i sur., 2016)

Proces sušenja raspršivanjem (slika 7) može se podijeliti u četiri koraka. U prvom koraku provodi se atomizacija otopine/suspenzije/emulzije. Stvaranjem vrlo sitnih kapljica povećava se ukupna površina tekućine što omogućuje povećanje učinkovitosti prijenosa topline i mase. U drugom koraku dolazi do stvaranja kontakta između kapljica i zraka za sušenje. Obzirom na smjer strujanja zraka i materijala koji se suši, sušenje raspršivanjem može se provoditi istosmjerno ili protusmjerno. U istosmjernoj konfiguraciji, vrući zrak i atomizirani materijal ulaze u komoru za sušenje s vrha, a izlaze na dnu. S druge strane, u protusmjernom načinu rada vrući zrak i atomizirani materijal ulaze u komoru sa suprotnih strana te se na taj način povećava vrijeme zadržavanja materijala u komori za sušenje. U prehrambenoj i farmaceutskoj industriji najčešće se koristi istosmjerni način rada kako bi vrijeme izloženosti čestica visokim temperaturama bilo što kraće. Treći korak podrazumijeva sušenje kapljica i formiranje čestica. U posljednjem koraku potrebno je odvojiti dobivene suhe čestice praha od mokrog zraka. Odvajanje se može provesti pomoću centrifugalne sile (cikloni), filtracijom (filter vreće) ili elektrostatskom precipitacijom. Najprikladniji način određuje se na temelju karakteristika proizvoda kao što su gustoća i veličina čestica te zahtjeva za rukovanje (Miller i sur., 2016).

Jedna od najvažnijih prednost sušenja raspršivanjem je kratko vrijeme sušenja (5-100 s) čime se sprječava gubitak visokovrijednih komponenata proizvoda kao što su na primjer nutrijenti te nosioci boje i okusa. Usprkos tome, zbog visokih temperatura ulaznog zraka (150-220 °C) i izlaznog zraka (50-80 °C) može doći do degradacije termolabilnih spojeva pa je važno postupak sušenja provoditi pri što nižim temperaturama. Proizvod dobiven sušenjem raspršivanjem zaštićen je od mikrobiološke aktivnosti i oksidacijskih reakcija (posmeđivanje, hidroliza, lipidna oksidacija, autooksidacija, enzimska aktivnost i dr.). Osim toga, uklanjanjem velikog dijela vode dobiva se proizvod smanjene mase što rezultira niže troškove pakiranja, skladištenja i prijevoza. Prahovi dobiveni ovom tehnologijom mogu se skladištiti od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o načinu pakiranja i ambalaži (Shishir i Chen, 2017).

2.4. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA

Hrana sadrži brojne nutrijente i bioaktivne komponente koje se mogu apsorbirati tijekom probave, no najprije se one moraju odvojiti od ostalih sastojaka. Otpuštanje komponenata i/ili njihovih frakcija pri čemu one postaju dostupne za apsorpciju tijekom probave u gastrointestinalnom traktu naziva se biodostupnost. Osim probave i asimilacije, biodostupnost uključuje intestinalni i jetreni metabolizam (presistemski metabolizam). Biodostupnost

predstavlja prvi korak u bioraspoloživosti neke komponente, a drugi korak je bioaktivnost. Bioaktivnost uključuje transport komponenata do ciljanih tkiva i njihovu asimilaciju, interakciju s biomolekulama, metabolizam i biotransformacije te fiziološki odgovor. Konačno, bioraspoloživost označava količinu nutrijenta ili bioaktivne komponente koju ljudski organizam može pohraniti ili iskoristiti u različitim metaboličkim i fiziološkim procesima (Grgić i sur., 2020). Bioučinkovitost se može definirati kao količina unesene hranjive tvari koji ima nutritivni učinak. Povećanje bioučinkovitosti bioaktivnih molekula, uključujući i fenolnih spojeva, postiže se poboljšanjem njihove bioraspoloživosti. Dosad je utvrđeno da se bioučinkovitost može spješiti: inkapsulacijom, fizikalnim i kemijskim modifikacijama bioaktivnih molekula pri čemu se povećava njihova topljivost i apsorpcija, korištenjem nanočestica, procesiranjem hrane te uporabom tvari koje povećavaju vrijeme gastrointestinalnog transporta (Botelho i sur., 2017).

2.4.1. Fenolni spojevi u gastrointestinalnom traktu

Probava hrane je složen proces, neophodan za održavanje zdravlja i dobrobiti ljudi, u kojem se hranjive tvari ekstrahiraju iz unesene hrane putem enzimskih, kemijskih i mehaničkih transformacija. Dezintegracija hrane uglavnom se odvija u usnoj šupljini i želucu, apsorpcija nutrijenata u tankom crijevu, a ostatak neprobavljive hrane potiskuje se u debelo crijevo koje završava anusom (Somaratne i sur., 2020). Razgradnjom hrane nutrijenti i bioaktivne komponente postaju dostupni za apsorpciju. Osim toga, sokovi koji se nalaze u želucu i tankom crijevu potiču oslobađanje enzima koji kataliziraju razgradnju ugljikohidrata, proteina, masti i manjih komponenata kao što su fenolni spojevi, karotenoidi, itd. Peristaltika crijeva uključena je u razgradnju, apsorpciju te transport neapsorbiranih komponenti hrane (Grgić i sur., 2020).

Probava fenolnih spojeva započinje u usnoj šupljini žvakanjem. Ovim procesom hrana se usitnjava na manje komadiće te se miješa sa slinom. Dezintegracija hrane omogućava djelomično oslobađanje komponenata te povećava pristup probavnim enzima sline. 99,5 % sadržaja sline čini voda, a preostalih 0,5 % elektroliti, proteini (mucin, albumini, imunoglobulini, laktoferin), antibakterijski spojevi (sekretorni IgA, lizozim), hormoni, nukleinske kiseline, antioksidacijski spojevi i probavni enzimi. Najdominantniji enzim sline, α -amilaza, ne utječe značajno na fenolne spojeve, no žvakanje i prisutnost sline doprinose povećanju biodostupnosti fenolnih spojeva u tankom crijevu. Osim toga, poznato je da se fenolni spojevi mogu taložiti s proteinima sline što smanjuje bioraspoloživost. Ovisno o vrsti

unesene hrane ili pića pH vrijednost u ovom dijelu probave kreće se između 6 i 7. Dezintegrirana hrana iz usne šupljine peristaltikom se prenosi u želudac gdje se zadržava od 20 minuta do 2 sata ovisno o količini i sastavu hrane. pH vrijednost u gastričnoj fazi iznosi oko 2. Miješanjem uz prisustvo kiselina dolazi do fizikalne i kemijske razgradnje komponenti hrane. Gastrična faza također doprinosi oslobađanju fenolnih spojeva iz hrane, osobito onih sa slabijim vezama. Kiseli uvjeti u želucu induciraju hidrolizu i dekonjugaciju fenolnih spojeva. Slobodne fenolne kiseline male molekulske mase mogu se apsorbirati u ovoj fazi. Neapsorbirane komponente prelaze u tanko crijevo pri čemu dolazi do promijene pH vrijednosti s 2-4 na 7. Dvanaesnik i jejunium glavni su dijelovi tankog crijeva u kojima dolazi do transformacija i apsorpcije fenolnih spojeva. Prilikom transporta iz želuca u dvanaesnik pH himusa mijenja se iz kiselog u lužnati zbog lučenja žučnih soli i soka gušterače. Ovisno o kemijskoj strukturi, neki fenolni spojevi nestabilni su u lužnatom mediju te dolazi do njihovog gubitka, a posljedično i do niže biorasploživosti. Ova tvrdnja osobito se odnosi na antocijane, flavonole i flavan-3-ole u dvanaesniku. Apsorpcija fenolnih spojeva u tankom crijevu ovisi o fiziologiji i anatomiji pojedinca, karakteristikama fenolnih spojeva (molekularna masa, stupanj polimerizacije, sterokemija i hidrofobnost) te prisutnosti drugih sastojaka hrane. Deglikozilacija fenolnih spojeva određuje put apsorpcije pri čemu se glikoni apsorbiraju aktivnim transportom, a aglikoni pasivnom difuzijom. U citosolu enterocita aglikoni se dalje transportiraju u krvotok ili se transformiraju metaboličkim reakcijama faze II pri čemu biorasploživost i bioučinkovitost fenolnih spojeva uvelike ovisi o prisutnim enzimima (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Najčešće se manje od 10 % fenolnih spojeva može apsorbirati kroz epitel tankog crijeva te ispoljiti učinak na ciljane vrste stanica ili tkiva. Preostali dio fenolnih spojeva odvodi se u debelo crijevo s ostatkom neprobavljene hrane gdje se može dalje metabolizirati i apsorbirati. Debelo crijevo sadrži velik broj različitih mikroorganizama, točnije oko 10^{12} mikroorganizama po gramu crijeva. Odnos između fenolnih spojeva i mikroflore debelog crijeva je recipročan. Mikroflora mijenja kemijsku strukturu fenolnih spojeva i sudjeluje u stvaranju metabolita što dovodi do povećanja biorasploživosti, a fenolni spojevi pozitivno utječu na sastav mikroflore (Grgić i sur., 2020; Shahidi i Peng, 2018). U debelom crijevu oslobađaju se mikrobnim enzimima koji cijepaju do tada neprobavljene fenolne spojeve na manje i jednostavnije komponente koje karakterizira dobra antioksidacijska aktivnost (Rocchetti i sur., 2018). Oslobodeni spojevi mogu se apsorbirati u sistemske cirkulacije ili ispoljiti pozitivne učinke na crijevnu mikrofloru. Nastali derivati fenolnih spojeva djeluju kao prebiotici pri čemu mijenjaju sadržaj crijevne mikroflore što u konačnici poboljšava zdravlje debelog crijeva. Mikrobnom konverzijom fenolnih spojeva u ovom dijelu probave izrazito varira od pojedinca do pojedinca zbog velike razlike u

sastavu crijevne mikroflore, kemijske strukture unesenih fenolnih spojeva te interakcija između fenolnih spojeva i crijevne mikroflore (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Neke od brojnih metaboličkih reakcija koje značajno doprinose apsorpciji su aromatska hidroliza, deglikozilacija, demetilacija i deglukuronidacija (Bohn i sur., 2018). Fenolni spojevi i njihovi derivati izlučuju se iz organizma putem urina ili fecesa (žuč) u roku od 24 sata nakon konzumacije (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Putem urina izlučuju se uglavnom mali, a fecesom veliki konjugirani metaboliti (Barros i Junior, 2019).

Bioraspoloživost fenolnih spojeva je zahtjevan proces koji obuhvaća nekoliko faza – oslobađanje, apsorpciju, distribuciju, metabolizam i naposljetku eliminaciju iz organizma (Botelho i sur., 2017). Najzastupljeniji fenolni spojevi u hrani nemaju nužno i najveću bioraspoloživost u organizmu. Razlog tome može biti slaba apsorpcija, niža bioaktivnost, uključivanje u brojne metaboličke reakcije i/ili brza eliminacija iz organizma. Biodostupni, a potencijalno i bioraspoloživi su fenolni spojevi koji su oslobođeni iz hrane uz pomoć probavnih enzima tankog crijeva ili crijevne mikroflore debelog crijeva. Bioraspoloživost fitokemikalija ovisi o njihovoj stabilnosti, oslobađanju iz matriksa hrane te učinkovitosti prolaska kroz staničnu membranu. Fenolni spojevi su učinkoviti samo ako su transportirani do odgovarajućih tkiva i djeluju u dovoljnoj količini (Barros i Junior, 2019). Svaki fenolni spoj ima drugačiju bioraspoloživost, a na brzinu i opseg apsorpcije najviše utječe kemijska struktura. Većina fenolnih spojeva u hrani nalazi se u obliku estera, polimera ili glikozida, a u tom obliku ne mogu biti apsorbirani (Grgić i sur., 2020). Da bi se apsorbirali, glikozidi se prvo moraju pocijepati pri čemu se nastaju aglikoni koji se dalje prenose u krvotok pasivnom difuzijom ili pomoću transportera. Nakon toga derivati fenolnih spojeva podliježu brojnim metaboličkim reakcijama, a neke od njih odvijaju se i u jetri (Bohn i sur., 2018).

Fenolni spojevi nisu jednoliko raspoređeni u namirnici. U voću i povrću većina fenolnih spojeva koncentrirana je u vanjskim slojevima. Na sadržaj fenolnih spojeva u hrani utječu uvjeti uzgoja, berbe i procesiranja, a stupanj apsorpcije ovisi o starosti i spolu osobe, fiziološkom stanju, crijevnoj mikroflori, enzimskoj aktivnosti i dr. (Grgić i sur., 2020). Osim toga, spojevi veće molekulske mase s katehinskom i epikatehinskom jedinicom slabo su topljivi u vodi pa se posljedično i slabo apsorbiraju. Ostali netopljivi fenolni spojevi kovalentno su vezani za neprobavljive komponente kao što su polisaharidi pektin, hemiceluloza, celuloza i strukturni proteini te se zbog toga vrlo slabo oslobađaju od ostatka hrane (Shahidi i Peng, 2018).

2.4.2. *In vitro* modeli probave

Zanimanje znanstvene zajednice za učinak hrane na zdravlje čovjeka u konstantnom je porastu. Jedan od načina za bolje razumjevanje učinka je proučavanje probave hrane u gastrointestinalnom traktu. Ljudski i životinjski probavni sustavi najbolji su za proučavanje, no zbog etičkih i ekonomskih razloga *in vivo* testovi vrlo se rijetko primjenjuju. Kao alternativa, često se koriste *in vitro* testovi. Oni mogu biti statički i dinamički. Statički *in vitro* testovi široko su korišteni u znanstvenim istraživanjima, no važno je naglasiti da ne mogu u potpunosti imitirati složenost zbivanja u probavnom sustavu. Često se koriste zbog jednostavnosti, visoke reproducibilnosti i niskih troškova. Uz to, za provođenje eksperimenta potrebna je jednostavna laboratorijska oprema (Gonçalves i sur., 2021). Unatoč tome, brojni protokoli za provođenje testova temelje se na različitim uvjetima (pH, trajanje pojedinih faza, količina enzima, žučnih soli i sl.) od onih u ljudskom probavnom traktu te zbog toga rezultati ovih testova često ne opisuju stvarno stanje. Osim toga, ne uzimaju u obzir kinetiku probave. Statički *in vitro* testovi najčešće se koriste za proučavanje probave pojedinačnih komponenti hrane, otkrivanje interakcija između različitih komponenti hrane na molekularnoj razini te za uspoređivanje probave slične hrane pod istim uvjetima (Bohn i sur., 2018). Dinamički *in vitro* testovi razvijeni su kako bi se unaprijedila simulacija probave. Uključuju miješanje, hidrataciju te peristaltiku, a cilj je simulirati varijacije u koncentraciji enzima, viskoznosti, veličini čestica, pH i raspodjele hranjivih tvari. Uz to, osigurava se transport probavljenih komponenti i kontinuirana sekrecija probavnih tekućina u gastrointestinalnom traktu. Posljedično, moguća je bolja predikcija mehanizama i procesa probave te strukturnih promjena komponenti hrane. Također omogućuje se preciznija procjena biodostupnosti pojedinih bioaktivnih komponenti (Gonçalves i sur., 2021). Dinamički *in vitro* testovi koriste se za proučavanje probave vrlo kompleksnih sustava hrane (Botelho i sur., 2017).

Za otpuštanje fenolnih spojeva iz matriksa hrane u *in vitro* modelima probave mora se imitirati nekoliko čimbenika, a to su žvakanje, mehanički pokreti u želucu te pH i enzimi specifičani za svaku fazu probave. Modeli najčešće obuhvaćaju oralnu, gastičnu i intestinalnu fazu, a ponekad i fermentaciju u debelom crijevu (Barros i Junior, 2019). Najvažniji ograničavajući faktor za predviđanje bioraspodjelivosti fenolnih spojeva u *in vitro* testovima je nepotpuna imitacija kompleksnosti zbivanja u debelom crijevu (Bohn i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNIDIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Za istraživanje korišteni su osušeni listovi koprive *Urticae folium* proizvođača Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska) serije 21-004 roka valjanosti do 31.12.2022. godine. Listovi su sakupljeni u Hrvatskoj te su čuvani na tamnom i suhom mjestu nakon sušenja. Prije istraživanja listovi su usitnjeni u električnom mlincu (CM3260, Grundig, Nuremberg, Njemačka) nakon čega je provedena ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (vrijeme 5 min, snaga 300 W, temperatura 60 °C). Ekstrakti listova koprive sušeni su raspršivanjem pomoću laboratorijskog uređaja za sušenje raspršivanjem (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Flawil, Švicarska). Proizvedeno je 18 inkapsuliranih ekstrakata listova koprive prema planu koji je prikazan u tablici 1. Sušenje raspršivanjem odvijalo se pri temperaturi od 120 °C te pri različitim omjerima suhe tvari ekstrakta i nosača – 1:1, 1:2 i 1:3. Korišteni su različiti nosači: maltodekstrin (MD), kombinacija maltodekstrina i arapske gume (MD + GA) u omjerima 50:50 i 75:25, β -ciklodekstrin (β -CD) te kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (β -CD + GA) u omjerima 50:50 i 75:25.

Tablica 1. Eksperimentalni dizajn sušenja raspršivanjem ekstrakata listova koprive

UZORAK	NOSAČ	OMJER UZORAK:NOSAČ
1	MD	1:1
2	MD+GA (50:50)	
3	MD+GA (75:25)	
4	β -CD	
5	β -CD+GA (50:50)	
6	β -CD+GA (75:25)	
7	MD	1:2
8	MD+GA (50:50)	
9	MD+GA (75:25)	
10	β -CD	
11	β -CD+GA (50:50)	
12	β -CD+GA (75:25)	
13	MD	1:3
14	MD+GA (50:50)	
15	MD+GA (75:25)	
16	β -CD	
17	β -CD+GA (50:50)	
18	β -CD+GA (75:25)	

MD-maltodekstrin; MD + GA-kombinacija maltodekstrina i arapske gume; β -CD- β -ciklodekstrin; β -CD + GA-kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume

3.1.2. Kemikalije

- metanol, 80 %-tni (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- natrijev klorid, 0,9 %-tna otopina

Priprema: 0,9 g natrijeva klorida (Lach-Ner, Neratovice, Češka) odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

- pepsin, 40 mg mL⁻¹

Priprema: 400 mg pepsina iz gastične mukoze svinje (Sigma-Aldrich, Gillingham, Ujedinjeno Kraljevstvo) odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te se nadopuni do oznake s 0,1 M klorovodičnom kiselinom (TKI, Hrastnik, Slovenija)

- natrijev hidrogenkarbonat, 0,5 M

Priprema: 1,0501 g natrijeva hidrogenkarbonata (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom

- natrijev hidrogenkarbonat, 1 M

Priprema: 8,401 g natrijeva hidrogenkarbonata (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake

- otopina pankreatin (2 mg mL⁻¹)-žučne soli (12 mg mL⁻¹)

Priprema: 0,1 g pankreatina iz gušterače svinje (Sigma-Aldrich, Shanghai, Kina) i 0,6 g žučnih soli (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake

- klorovodična kiselina, 0,1 M (TKI, Hrastnik, Slovenija)

- destilirana voda

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)

- zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska)

- klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330 μ L 37 %-tne otopine klorovodične kiseline (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska) i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL

- TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin), 10 mM

Priprema: 0,0312 g TPTZ-a (Sigma-Aldrich, Buchs, Švicarska) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom

- željezo (III) klorid heksahidrat, 20 mM

Priprema: 0,541 g željezo (III) klorida 6-hidrata (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom

- glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Italija)
- acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: 3,1 g natrijeva acetata trihidrata (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L te se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline (Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Italija) i nadopuni destiliranom vodom do oznake

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida heksahidrata u omjeru 10:1:1

- standard askorbinske kiseline, 100 mg L⁻¹

Priprema: 0,100 g askorbinske kiseline (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake

- etanol, 96 %-tni (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Trolox, 2 mM ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)

Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa (Sigma-Aldrich, Moskva, Ruska Federacija) u plastičnoj lađici za vaganje te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- standard galne kiseline

Priprema: 0,5 g galne kiseline (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se otopi

u 10 mL 96 %-tnog etanola (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i nadopuni destiliranom vodom do oznake

3.1.3. Aparatura

- analitička vaga (Adventurer™, Ohaus, Parsippany, SAD)
- ultrazvučna kupelj (DT 512 H, Bandelin Electronic, Berlin, Njemačka)
- vodena kupelj s ugrađenom tresilicom (SBS40, Stuart, Staffordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- vodena kupelj (Heating Bath B-490, Büchi, Flawil, Švicarska)
- spektrofotometar (UV-1600 PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- epruvete
- Falcon kivete (50 mL)
- filter papir
- filter veličine pora 0,20 µm (Chromafil Xtra PA-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka)
- kivete
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)
- membrane za dijalizu (Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000, Sigma-Aldrich, Jerusalem, Izrael)
- menzura (100 mL)
- metalna pinceta
- metalna špatula
- metalna žličica
- mikropipete (10-100 µL, 100-1000 µL i 0,5-5 mL) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- odmjerne tikvice (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL)
- pH indikatorski papir
- plastične lađice za vaganje
- plastične šprice
- stakleni lijevak
- staničevina

- viala (1,5 mL) (N9, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka)
- navojni čepovi za viala (N9 PP, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema početnog uzorka inkapsuliranog ekstrakta lista koprive

Odvaga inkapsuliranog ekstrakta lista koprive (1 g) odvaže se pomoću analitičke vage u Falcon kivete volumena 50 mL te se potom doda 10 mL 80 %-tog metanola. Tako pripremljeni uzorci stave se u ultrazvučnu kupelj na temperaturu od 50 °C 20 minuta. Uzorci se profiltriraju kroz filter papir, a nakon toga izuzme se 2 mL uzorka te se profiltrira kroz 0,2 µm filter. Uzorci se do daljnjih analiza čuvaju pri -18 °C.

3.2.2. Određivanje bioraspoloživosti

Bioraspoloživost ekstrakata koprive određuje se prema modificiranoj metodi opisanoj u istraživanjima McDougall i sur. (2007) te Gunathilake i sur. (2018). Metoda se sastoji od tri faze - gastrična, apsorbirana i intestinalna. Nakon svake faze izuzima se alikvot kojem se određuju ukupni fenolni spojevi i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

3.2.2.1. Gastrična faza

Odvaga inkapsuliranog ekstrakta lista koprive (250 mg) odvaže se pomoću analitičke vage u Falcon kivete volumena 50 mL te se u njih doda 10 mL 0,9 %-tne otopine natrijeva klorida i 800 µL 40 mg mL⁻¹ otopine pepsina. Uzorcima se podese pH vrijednost na 2 dodavanjem 0,1 M klorovodične kiseline. Vrijednost pH smjese provjerava se pomoću pH indikatorskog papira. Uzorci se inkubiraju 1 h na temperaturi od 37 °C pri 100 okretaja u minuti (eng. *revolutions per minute*, rpm) u vodenoj kupelji s ugrađenom tresilicom. Na poslijetku izuzme se 2 mL alikvota iz gastrične faze za daljnje analize te se profiltrira kroz 0,2 µm filter. Uzorci se stave na led kako bi se zaustavila reakcija.

3.2.2.2. Apsorbirana faza

U membrane za dijalizu doda se 1 mL 0,9 %-tne otopine natrijeva klorida i 1 mL 0,5 M natrijeva hidrogenkarbonata te se one vrata u preostali volumen gastrične otopine. Uzorci se inkubiraju pri temperaturi od 37 °C pri 100 okretaja u minuti 45 min u vodenoj kupelji s

ugrađenom tresilicom čime se stimulira prijelaz smijese iz želuca u tanko crijevo. Nakon toga uzorcima se podesi pH vrijednost na 6,5 dodatkom 1 M natrijeva hidrogenkarbonata.

3.2.2.3. *Intestinalna faza*

U uzorke podešene pH vrijednosti doda se otopina pankreatin (2 mg mL^{-1})-žučne soli (12 mg mL^{-1}) u volumenu izračunatom u odnosu na preostali volumen gastrične otopine (prema metodi korištenoj u istraživanju McDougall i sur. (2007) $4,5 \text{ mL}$ otopine na 18 mL preostale gastrične otopine) te se uzorci inkubiraju 2 h pri temperaturi od 37 °C pri 100 okretaja u minuti u vodenoj kupelji s ugrađenom tresilicom. Uzorci se stave na led 5 min kako bi se zaustavila reakcija. Po završetku reakcije uzorcima se izmjeri pH vrijednost pomoću pH indikatorskog papira, a očekivana vrijednost trebala bi biti između 7 i 7,5.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Ukupni fenolni spojevi određuju se početnim uzorcima inkapsuliranih ekstrakata listova koprive te nakon provedene gastrične, apsorbirane i intestinalne faze. Sva određivanja provode se u paraleli.

Princip određivanja:

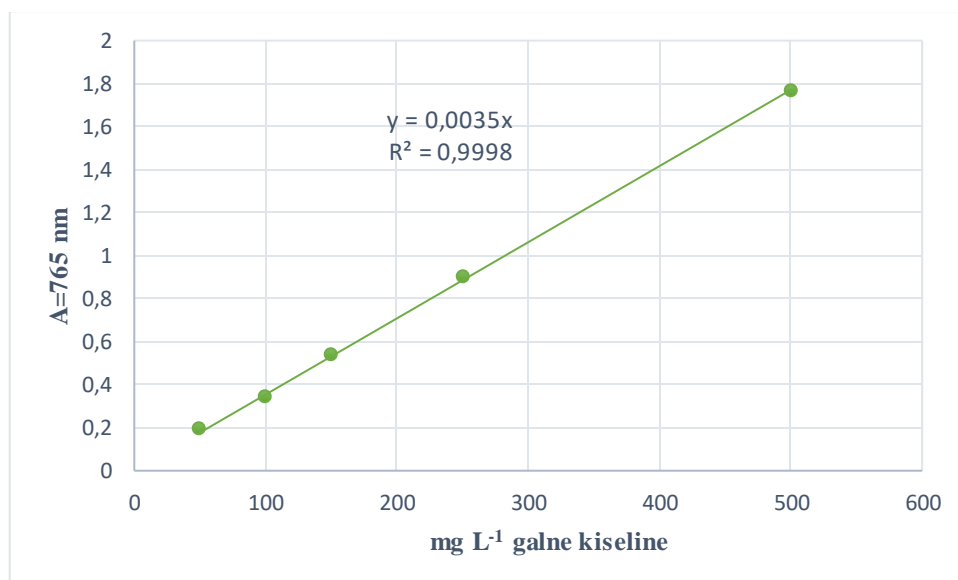
Određivanje ukupne koncentracije fenolnih spojeva provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Nastali plavo obojeni kompleks intenzivniji je što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima, a intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se otpipetira $100 \text{ }\mu\text{L}$ ekstrakta, $200 \text{ }\mu\text{L}$ Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Nakon toga slijedi miješanje na vortex miješalici i termostatiranje pripremljenih uzoraka 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u vodenoj kupelji. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm na spektrofotometru. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo (80 \% -tni metanol).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaž se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću vortex miješalice, a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u vodenoj kupelji. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm na spektrofotometru. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 8). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad [1]$$

$$R^2 = 0,9998$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm (-)

X – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije (-)

Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva izražene su u mg GAE g^{-1} s. tv. inkapsuliranog ekstrakta lista koprive kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet određuje se početnim uzorcima inkapsuliranih ekstrakata listova koprive te nakon provedene gastrične, apsorbirane i intestinalne faze *in vitro* testa probave. Sva određivanja provode se u paraleli.

Princip određivanja:

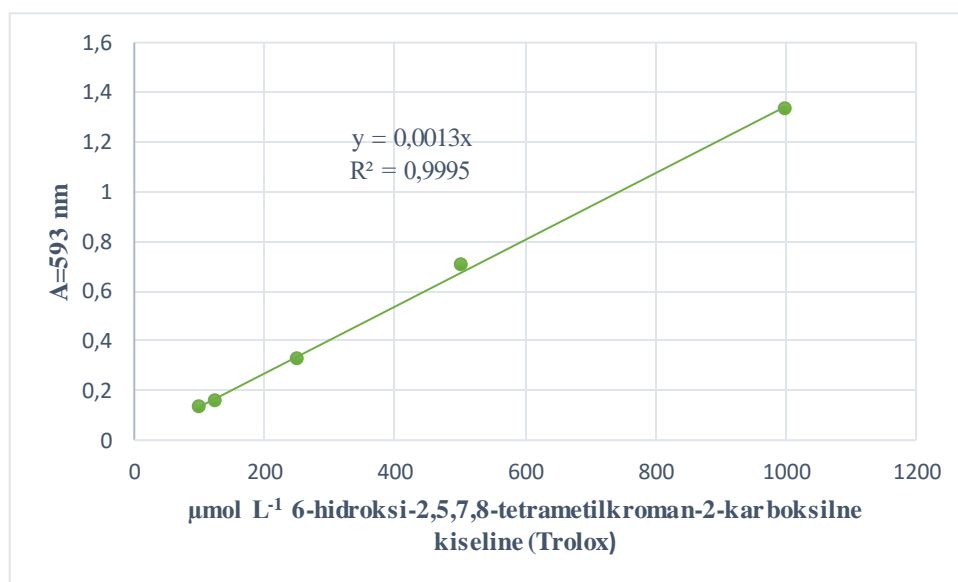
FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko željezovog (II) sulfata, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa pomoću vortex miješalice te 5 minuta termostatira u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm na spektrofotometru. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje ekstrakcijsko otapalo (80 %-tni metanol).

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom: 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom se nadopunjavaju do oznake 96 %-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje pomoću vortex miješalice i termostatiranje pri temperaturi od 37 °C u vodenoj kupelji. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm na spektrofotometru. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 80 %-tni metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 9). Antioksidacijski kapacitet uzorka izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad [2]$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm (-)

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

R^2 – koeficijent determinacije (-)

Antioksidacijski kapacitet izražen je u mmol TE 100 g^{-1} s. tv. inkapsuliranog ekstrakta lista koprive kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijalni dizajn. Postupak inkapsulacije ekstrakta koprive proveden je s ciljem optimiranja inkapsulacijskih parametara pri čemu su nezavisne varijable bile vrsta nosača (maltodekstrin, kombinacija maltodekstrina i arapske gume u omjerima 50:50 i 75:25, β -ciklodekstrin te kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume u omjerima 50:50 i 75:25) i omjer suhe tvari ekstrakta i nosača (1:1, 1:2, 1:3), a kao zavisne varijable promatrane su koncentracija fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u inkapsuliranim ekstraktima te koncentracija fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u tri faze *in vitro* simulacije probave. Za usporedbu uzoraka korištena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA), statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivana je bioraspoloživost fenolnih spojeva iz inkapsuliranih ekstrakata listova koprive pomoću simulirane probave. *In vitro* test sastojao se od tri faze - gastrične, apsorpcijske i intestinalne. Uvjeti su simulirani podešavanjem temperature medija na 37 °C, mijenjanjem pH vrijednosti pri prelasku iz jedne faze sustava u drugu te dodavanjem probavnih enzima karakterističnih za svaku fazu. Nakon svake faze određivala se koncentracija fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Istraživanje je provedeno na 18 uzoraka koji su se međusobno razlikovali prema vrsti nosača korištenih tijekom sušenja raspršivanjem te omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača. Dobiveni rezultati prikazani su tablično. U tablici 2 prikazana je koncentracija fenolnih spojeva određena Folin-Ciocalteu metodom, a u tablici 4 antioksidacijski kapacitet inkapsuliranih ekstrakata listova koprive određen FRAP metodom. Tablice 3 i 5 daju uvid u analizu varijance utjecaja vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet. Na slici 10 prikazana je usporedba koncentracija fenolnih spojeva neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka za koji je određeno da se najviše apsorbirao u *in vitro* testu probave, a na slici 11 prikazana je usporedba antioksidacijskog kapaciteta neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka najboljeg antioksidacijskog kapaciteta u simuliranom testu probave.

Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu i prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija. Statistička obrada podataka provedena je u programskom sustavu Statistica 8.0. (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

4.1. SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE

Tablica 2. Koncentracija ($\bar{x} \pm$ standardna devijacija) fenolnih spojeva u početnom uzorku inkapsuliranih ekstrakata listova koprive te u svim fazama *in vitro* probave određena Folin-Ciocalteu metodom

uzorak	nosač	omjer s. tv. ekstrakt: nosač	početni uzorak (mg GAE g ⁻¹ s.tv. ekstrakta)	gastroična faza		apsorpcijska faza		intestinalna faza	
				mg GAE g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%	mg GAE g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%	mg GAE g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%
1	MD	1:1	16,80 ± 0,23	28,33 ± 0,04	168,63 ± 2,57	1,81 ± 0,09	6,39 ± 0,34	26,36 ± 0,14	156,90 ± 1,30
2	MD+GA (50:50)		18,29 ± 0,13	27,44 ± 0,20	149,99 ± 2,12	2,62 ± 0,01	9,56 ± 0,09	32,47 ± 1,09	177,53 ± 7,17
3	MD+GA (75:25)		16,83 ± 0,04	27,31 ± 0,05	162,27 ± 0,14	3,09 ± 0,12	11,33 ± 0,40	26,56 ± 0,19	157,84 ± 0,74
4	β-CD		17,97 ± 0,29	31,35 ± 0,22	174,55 ± 4,11	3,17 ± 0,09	10,10 ± 0,21	25,10 ± 0,10	139,73 ± 2,82
5	β-CD+GA (50:50)		21,00 ± 0,25	29,23 ± 0,07	139,21 ± 1,99	2,34 ± 0,01	8,02 ± 0,06	25,42 ± 1,38	121,02 ± 5,11
6	β-CD+GA (75:25)		21,65 ± 0,02	30,56 ± 0,07	141,17 ± 0,44	2,50 ± 0,00	8,17 ± 0,03	30,70 ± 0,33	141,82 ± 1,39
7	MD	1:2	14,77 ± 0,00	11,94 ± 0,84	80,84 ± 5,66	2,54 ± 0,18	21,37 ± 3,01	31,74 ± 0,43	214,89 ± 2,89
8	MD+GA (50:50)		18,96 ± 0,52	17,88 ± 0,28	94,39 ± 4,06	2,28 ± 0,16	12,77 ± 1,07	26,06 ± 0,63	137,48 ± 0,47
9	MD+GA (75:25)		17,90 ± 0,06	14,60 ± 0,54	81,58 ± 3,33	1,95 ± 0,28	13,33 ± 1,39	26,53 ± 0,58	148,19 ± 3,75
10	β-CD		12,06 ± 0,47	23,61 ± 0,20	195,94 ± 6,03	3,24 ± 0,09	13,72 ± 0,25	28,11 ± 1,22	233,55 ± 19,29
11	β-CD+GA (50:50)		12,20 ± 0,03	27,68 ± 0,03	226,97 ± 0,87	1,55 ± 0,03	5,61 ± 0,10	22,13 ± 1,45	181,45 ± 11,43
12	β-CD+GA (75:25)		9,38 ± 0,06	17,19 ± 0,89	183,25 ± 8,19	4,09 ± 0,10	23,85 ± 1,82	24,52 ± 1,48	261,39 ± 14,03
13	MD	1:3	13,56 ± 0,26	13,13 ± 0,27	96,82 ± 0,18	1,84 ± 0,10	14,02 ± 1,02	22,44 ± 0,67	165,61 ± 8,09
14	MD+GA (50:50)		14,94 ± 0,30	25,83 ± 1,52	172,81 ± 6,68	1,57 ± 0,01	6,10 ± 0,33	20,55 ± 0,39	137,58 ± 5,40
15	MD+GA (75:25)		10,30 ± 0,37	14,70 ± 1,11	142,94 ± 15,94	1,40 ± 0,07	9,60 ± 1,18	24,16 ± 0,47	234,76 ± 13,08
16	β-CD		15,62 ± 0,08	40,79 ± 0,63	261,13 ± 2,62	2,02 ± 0,02	4,95 ± 0,03	22,44 ± 0,81	143,64 ± 4,43
17	β-CD+GA (50:50)		13,55 ± 0,04	34,50 ± 1,43	254,67 ± 11,34	2,48 ± 0,00	7,19 ± 0,30	27,65 ± 0,09	204,07 ± 1,33
18	β-CD+GA (75:25)		21,30 ± 0,29	34,00 ± 0,18	159,64 ± 1,36	2,21 ± 0,04	6,49 ± 0,09	26,63 ± 0,96	124,98 ± 2,77

MD-maltodekstrin; MD + GA-kombinacija maltodekstrina i arapske gume; β-CD-β-ciklodekstrin; β-CD + GA- kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume; GAE- galna kiselina

Koncentracije fenolnih spojeva početnih uzoraka inkapsuliranih ekstrakta listova koprive i svih faza simulirane probave prikazane su u tablici 2., a određene su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom. Vrijednosti koncentracija fenolnih spojeva u početnom uzorku određene su u rasponu od $9,38 \pm 0,06$ do $21,65 \pm 0,02$ mg GAE g^{-1} suhe tvari (s.tv.) ekstrakta. Najviša koncentracija fenolnih spojeva u početnom uzorku inkapsuliranog ekstrakta lista koprive u vrijednosti od $21,65 \pm 0,02$ mg GAE g^{-1} suhe tvari ekstrakta određena je uzorku u kojem je kao nosač tijekom sušenja raspršivanjem korištena kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1. S druge strane, najniža vrijednost fenolnih spojeva, $9,38 \pm 0,06$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, određena je u uzorku u kojem je nosač bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Nakon provedene gastrične faze najviša koncentracija fenolnih spojeva, u vrijednosti od $40,79 \pm 0,63$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, zabilježena je u uzorku u kojem je nosač bio β -ciklodekstrin s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. Najnižu koncentraciju, $11,94 \pm 0,84$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, u ovoj fazi imao je uzorak čiji je nosač bio maltodekstrin, a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. U apsorpcijskoj fazi najviše fenolnih spojeva, $4,09 \pm 0,10$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, zabilježeno je u uzorku s kombinacijom nosača β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) te omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Ovaj uzorak je ujedno imao i najviši početni sadržaj fenolnih spojeva. S druge strane, najniža koncentracija, $1,40 \pm 0,07$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, zabilježena je u uzorku čiji je nosač bila kombinacija maltodekstrina i arapske gume (75:25), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. Konačno, u intestinalnoj fazi uzorak s nosačem kombinacije maltodekstrina i arapske gume (50:50) te omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1 posjedovao je najvišu koncentraciju fenolnih spojeva, $32,47 \pm 1,09$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta. Najniža koncentracija u vrijednosti od $20,55 \pm 0,39$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta zabilježena je u uzorku s nosačem kombinacije maltodekstrina i arapske gume (50:50) te omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3.

U gastričnoj fazi najveći postotak fenolnih spojeva, $261,13 \pm 2,62$ % od početne količine, zabilježen je u uzorku čiji je nosač bio β -ciklodekstrin, a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. Ovom uzorku ujedno je određena i najveća koncentracija fenolnih spojeva. Najmanji postotak fenolnih spojeva od početne količine, $80,84 \pm 5,66$ %, zabilježen je u uzorku s najmanjom koncentracijom fenolnih spojeva, tj. uzorku kojem je nosač bio maltodekstrin s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Na temelju rezultata apsorpcijske faze vidljivo je da se najviši postotak fenolnih spojeva apsorbirao u uzorku čiji su nosači bili kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2 i to u vrijednosti od $23,85 \pm 1,82$ % od početne količine. Najniži postotak apsorpcije, $5,61 \pm 0,10$ %, utvrđen je

u uzorku čiji su nosači bili β -ciklodekstrin i arapska guma (50:50), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. U intestinalnoj fazi uzorku kojem je nosač tijekom sušenja raspršivanjem bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) te omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2 određen je najviši postotak fenolnih spojeva, $261,39 \pm 14,03$ % od početne količine. Najniži postotak, $121,02 \pm 5,11$ % od početne količine, zabilježen je u uzorku čiji su nosači bili β -ciklodekstrin i arapska guma (50:50), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1.

U istraživanju Kalajahi i Ghandiha (2022) koncentracija fenolnih spojeva u početnom uzorku inkapsuliranih ekstrakata koprive kretala se od 18,19 do 56,67 mg GAE g⁻¹ ekstrakta. Prema Bonetti i sur. (2016) najzastupljeniji fenolni spojevi u ekstraktu lista koprive su derivati hidroksicimetnih kiselina i flavonoidi.

Repajić i sur. (2021) proučavali su utjecaj fenološke faze razvoja koprive na udio bioaktivnih komponenti u listovima i stabljici ubranih na različitim područjima diljem Hrvatske. Fenolni spojevi određeni su UPLC-MS/MS analizom pri čemu su rezultati ukazivali da se najviša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, $5,13 \pm 0,01$ mg g⁻¹, nalazi u ekstraktu listova ubranih u kontinentalnom dijelu Hrvatske u fazi prije cvjetanja. Osim toga, proveli su i identifikaciju te kvantifikaciju fenolnih spojeva. Identificiran je 41 fenolni spoj koji pripada skupinama: benzojeve, hidroksicimetne i drugih kiselina, flavonola, flavan-3-ola, flavona, izoflavona, flavanona te kumarina. Hidroksicimentne kiseline, u najvišoj koncentraciji od 2,27 mg g⁻¹, bile su najzastupljenija grupa fenolnih spojeva.

Tablica 3. Analiza varijance utjecaja vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na koncentraciju fenolnih spojeva

FENOLNI SPOJEVI	N	početni uzorak (mg GAE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta)	gastroična faza %	apsorpcijska faza %	intestinalna faza %
nosač		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
MD	6	15,04 ± 0,10 ^a	115,43 ± 2,42 ^a	13,93 ± 0,41 ^e	179,13 ± 3,20 ^b
MD+GA (50:50)	6	17,40 ± 0,10 ^c	139,06 ± 2,42 ^b	9,48 ± 0,41 ^b	150,87 ± 3,20 ^a
MD+GA (75:25)	6	15,01 ± 0,10 ^a	128,93 ± 2,42 ^b	11,42 ± 0,41 ^{cd}	180,26 ± 3,20 ^b
β-CD	6	15,21 ± 0,10 ^{ab}	210,54 ± 2,42 ^d	9,59 ± 0,41 ^{bc}	172,31 ± 3,20 ^b
β-CD+GA (50:50)	6	15,58 ± 0,10 ^b	206,95 ± 2,42 ^d	6,94 ± 0,41 ^a	168,85 ± 3,20 ^b
β-CD+GA (75:25)	6	17,44 ± 0,10 ^c	161,35 ± 2,42 ^c	12,83 ± 0,41 ^{de}	176,06 ± 3,20 ^b
omjer s.tv. ekstrakt:nosač		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
1:1	12	18,76 ± 0,07 ^c	155,97 ± 1,71 ^b	8,93 ± 0,29 ^a	149,14 ± 2,26 ^a
1:2	12	14,21 ± 0,07 ^a	143,83 ± 1,71 ^a	15,11 ± 0,29 ^b	196,16 ± 2,26 ^c
1:3	12	14,88 ± 0,07 ^b	181,33 ± 1,71 ^c	8,06 ± 0,29 ^a	168,44 ± 2,26 ^b
prosječna vrijednost	36	15,95 ± 0,60	160,38 ± 8,74	10,70 ± 0,87	171,25 ± 6,93

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

*a,b,c,d,e – različite oznake unutar stupca odnose se na statistički značajne razlike razmatrane na razini $p \leq 0,05$
 MD-maltodekstrin; MD + GA-kombinacija maltodekstrina i arapske gume; β-CD-β-ciklodekstrin; β-CD + GA-kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume; GAE- galna kiselina

Analiza varijance utjecaja vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na koncentraciju fenolnih spojeva u početnom uzorku inkapsuliranih ekstrakata koprive te svih faza *in vitro* probave prikazana je u tablici 3. Na temelju MANOVA analize varijance utvrđen je statistički značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na koncentraciju fenolnih spojeva. Početnim uzorcima čiji je nosač tijekom sušenja raspršivanjem bila kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume (75:25) te kombinacija maltodekstrina i arapske gume (50:50) određena je najviša koncentracija fenolnih spojeva. S druge strane, najniža koncentracija određena je uzorcima čiji su nosači bili maltodekstrin te kombinacija maltodekstrina i arapske gume (75:25). U gastroičnoj fazi uzorcima čiji su nosači bili β-ciklodekstrin i kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume (50:50) određena je najveća koncentracija fenolnih spojeva, a najniža u uzorcima čiji je nosač bio maltodekstrin. Nadalje, u apsorpcijskoj fazi uzorci čiji su nosači bili maltodekstrin te kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume (75:25) posjedovali su najviše koncentracije fenolnih spojeva. Najniža koncentracija u ovoj fazi zabilježena je kada je kao nosač bila korištena kombinacija β-

ciklodekstrina i arapske gume (50:50). Na posljertku, u intestinalnoj fazi statistički značajna razlika zabilježena je samo u uzorcima čiji su nosači bili maltodekstrin i arapska guma (50:50) pri čemu je njima određena niža koncentracija fenolnih spojeva.

Općenito gledajući, uzorci čiji je nosač tijekom sušenja raspršivanjem bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume u omjeru 75:25 postigli su najveću apsorpciju fenolnih spojeva u *in vitro* testu probave, dok se kao najbolji omjer suhe tvari ekstrakta i nosača pokazao 1:2.

Temeljem analize varijance utvrđeno je da je najveća količina fenolnih spojeva oslobođena u intestinalnoj fazi. Više istraživača navodi isti zaključak. Shahidi i Peng (2018) zaključili su da u trofaznom *in vitro* testu probave do najvećeg oslobođenja fenolnih spojeva dolazi u intestinalnoj fazi. Zokti i sur. (2016) smatraju da je najveći dio fenolnih spojeva otpušten u intestinalnoj fazi zbog izraženijih interakcija između molekula vode i mikročestica amorfne prahe što posljedično povećava topljivost fenolnih spojeva. Isto tako, oslobađanju fenolnih spojeva doprinosi disocijacija mikročestica prahe do koje dolazi zbog promjene pH vrijednosti prilikom prelaska sadržaja iz gastrične u intestinalnu fazu. Nadalje, visoka topljivost nosača, u njihovom slučaju maltodekstrina, te hidrofilnost arapske gume također su doprinijeli brzom otpuštanju. Ydjedd i sur. (2017) također su dokazali da se koncentracija fenolnih spojeva inkapsuliranog ekstrakta rogača povećava postupno tijekom probave pri čemu su najviše koncentracije zabilježene u intestinalnoj fazi. U ovom i prethodno navedenim istraživanjima dokazano je da se inkapsulacijom učinkovito štite fenolni spojevi od nepovoljnih uvjeta u gastrointestinalnom traktu.

Provedena su slična istraživanja bioraspoloživosti inkapsuliranih ekstrakata drugih sirovina. Jedno od njih je i istraživanje Muellera i sur. (2018) gdje se proučavala bioraspoloživost inkapsuliranih antocijana ekstrakta borovnice u gastrointestinalnom traktu ljudi. Kontrolna grupa ispitanika konzumirala je neinkapsulirani ekstrakt borovnice, a druga grupa inkapsulirani ekstrakt pri čemu su nosači bili proteini sirutke i citratni pektin. Istraživači su utvrdili da se biodostupnost antocijana povećava u tankom crijevu kada je kao nosač korišten pektin izoliran iz citrusa, dok su proteini sirutke uzrokovali kratkoročnu bioraspoloživost.

U radu Grgić i sur. (2020) navodi se da je udio apsorbiranih fenolnih spojeva u gornjem gastrointestinalnom sustavu relativno mali u odnosu na količinu koja se unosi putem hrane. Pretpostavlja se da se samo 5-10 % fenolnih spojeva apsorbira u tankom crijevu, a najveći dio u debelom crijevu zbog kemijske modifikacije koju provode tamo prisutni mikroorganizmi (Bonetti i sur., 2016). U ovom radu prosječna vrijednost apsorbiranih fenolnih spojeva iznosi $10,70 \pm 0,87$ %.

Unatoč tvrdnji da su fenolni spojevi bolje očuvani pri višim koncentracijama nosača (Kalajahi i Ghandiha, 2022; Singh i sur., 2019), u ovom radu to nije u potpunosti dokazano. U početnom uzorku najviša koncentracija fenolnih spojeva utvrđena je kada je omjer suhe tvari ekstrakta i nosača bio 1:1, a najniža pri omjeru 1:2. Najviša koncentracija fenolnih spojeva u gastričnoj fazi utvrđena je kada je omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača iznosio 1:3, a najniža pri omjeru 1:2. Nadalje, u apsorpcijskoj fazi omjer 1:2 imao je višu koncentraciju fenolnih spojeva u odnosu na preostala dva. U intestinalnoj fazi najvišu koncentraciju fenolnih spojeva dao je omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2, a najnižu 1:1. Prema Sablania i Bosco (2018) nosači djeluju kao polimerne prevlake koje štite bioaktivne komponente te ih otpuštaju u odgovarajućim uvjetima. S druge strane, Shishir i Chen (2017) zaključili su da koncentracija nosača u procesu sušenja raspršivanjem ovisi o sirovini, vrsti i svojstvima nosača te željenim karakteristikama konačnog proizvoda. Uz to, navode da se ne može općenito preporučiti najoptimalniji omjer suhe tvari ekstrakta i nosača, već da se to određuje individualno za svaki slučaj.

Zokti i sur. (2016) zaključili su da na koncentraciju fenolnih spojeva utječe i sastav korištenog nosača. U radu su istraživali učinak inkapsulacije ekstrakta zelenog čaja na koncentraciju fenolnih spojeva pri čemu je inkapsulacija provedena sušenjem raspršivanjem, a od nosača korišteni su maltodekstrin, arapska guma, kitozan te njihove kombinacije u različitim omjerima. U istraživanju najniže koncentracije fenolnih spojeva zabilježene su kada se kao nosač za sušenje raspršivanjem koristio samo maltodekstrin ili arapska guma dok su najbolji rezultati zabilježeni korištenjem kombinacije više nosača. Kao nosač s najboljim svojstvima u inkapsulaciji bioaktivnih komponenti pokazala se arapska guma, a potom kombinacije arapske gume i maltodekstrina. Kitozan se nije pokazao osobito učinkovitim zbog velike viskoznosti. Najviša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva zabilježena je uporabom nosača kombinacije maltodekstrina, arapske gume i kitozana u omjeru 25:74:1. U ovom radu također se najviša koncentracija fenolnih spojeva apsorbirala kada je tijekom sušenja raspršivanjem korištena kombinacija nosača, točnije kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume u omjeru 75:25.

Postoji nekoliko ranijih istraživanja koja su se bavila sličnom tematikom. Kalajahi i Ghandiha (2022) bavili su se optimiranjem parametara sušenja raspršivanjem kako bi proveli inkapsulaciju ekstrakta koprive. Od nosača koristili su samo maltodekstrin pri čemu se njegova koncentracija kretala 10-20 g 100 g⁻¹, a temperatura ulaznog zraka od 110 do 150 °C. Najoptimalniji uvjeti inkapsuliranja ekstrakta koprive ostvareni su pri temperaturi ulaznog zraka od 150 °C te koncentraciji maltodekstrina od 16,9 g 100 g⁻¹. Iako je veća učinkovitost i prinos inkapsulacije ostvaren povećanjem temperature ulaznog zraka te koncentracije

maltodekstrina, istraživači su naveli kako je potrebno smanjiti temperaturu ulaznog zraka da bi se očuvali termolabilni fenolni spojevi te zadržao povoljan antioksidacijski kapacitet.

Najčešće korišteni nosači tijekom sušenja raspršivanjem sokova od voća i povrća te biljnih ekstrakata su maltodekstrin i arapska guma zbog velike molekulske mase, visoke temperature staklastog prijelaza, dobre topljivosti te niske viskoznosti. S druge strane, u slučaju kada proizvod ima veću nasipnu gustoću, kao što je inkapsulat lista kadulje, β -ciklodekstrin pokazao se kao bolja alternativa (Shishir i Chen, 2017).

U radu Belščak-Cvitanović i sur. (2011) istraživao se fenolni i mineralni sastav te antioksidacijski kapacitet inkapsuliranih ekstrakata ljekovitog bilja (lista kupine, gloga, koprive, masline, stolisnika te bršljana). Ekstrakti su inkapsulirani u mikrozrnca od alginata i kitozana pomoću elektrostatske ekstruzije. Najviša koncentracija fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet zabilježeni su u inkapsulatu lista kupine, a najniži u listu masline. Najslabiji inkapsulacijski potencijal od analiziranih ekstrakata pokazala je kopriva zbog visoke koncentracije dvovalentnih kationa koji utječu na proces gelacije alginata.

Iz rezultata je vidljivo da je u gastričnoj i intestinalnoj fazi određeno preko 100 % fenolnih spojeva u odnosu na količinu u početnom uzorku. Do istog zaključka došli su i znanstvenici Zhang i sur. (2020). Oni smatraju da je uzrok ove pojave kidanje kemijskih veza između bioaktivnih komponenti i ostalih komponenti hrane u kiselom mediju gastrične faze. Fenolni spojevi u obliku estera, glikozida i polimera ne mogu se apsorbirati tijekom probave. Modifikacije fenolnih spojeva pospješuju se u odgovarajućem pH te djelovanjem enzima kao što su pepsin i tripsin. U njihovom istraživanju nakon gastrične faze biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva različitih vrsta kvinoje kretala se između 87,6 i 116,7 %, a nakon intestinalne u rasponu od 89,6 do 124,5 %. U ovom radu biodostupnost fenolnih spojeva nakon gastrične faze iznosila je između $80,84 \pm 5,66$ i $261,13 \pm 2,62$ %, a nakon intestinalne faze od $121,02 \pm 5,11$ do $234,76 \pm 13,08$ %. Svi fenolni spojevi prisutni u simuliranoj fazi tankog crijeva (intestinalnoj fazi) nisu bili dostupni za apsorpciju. Spojevi odgovarajuće molekularne konfiguracije apsorbiraju se pasivnom difuzijom kroz barijere epitelnih stanica tankog crijeva, a u *in vitro* testu to je bilo simulirano pomoću membrana za dijalizu. U ovom radu apsorbirano je fenolnih spojeva u rasponu od $4,95 \pm 0,03$ do $23,85 \pm 1,82$ %.

4.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE

Tablica 4. Antioksidacijski kapacitet ($\bar{x} \pm$ standardna devijacija) u početnom uzorku inkapsuliranih ekstrakata listova koprive te u svim fazama *in vitro* probave određen FRAP metodom

uzorak	nosač	omjer s.tv. ekstrakt:nosač	početni uzorak (mmol TE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta)	gastrična faza		apsorpcijska faza		intestinalna faza	
				mmol TE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%	mmol TE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%	mmol TE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta	%
1	MD	1:1	9,69 ± 0,05	21,45 ± 0,42	221,34 ± 3,32	1,42 ± 0,04	14,64 ± 0,52	16,47 ± 0,16	170,01 ± 0,86
2	MD+GA (50:50)		11,88 ± 0,18	19,54 ± 0,90	164,38 ± 5,10	1,50 ± 0,02	12,66 ± 0,01	26,80 ± 0,00	225,51 ± 3,41
3	MD+GA (75:25)		10,37 ± 0,24	22,33 ± 0,12	215,32 ± 3,79	1,31 ± 0,01	12,63 ± 0,19	19,13 ± 0,23	184,47 ± 2,07
4	β-CD		11,15 ± 0,06	26,81 ± 0,85	240,42 ± 8,81	1,40 ± 0,03	12,55 ± 0,23	22,37 ± 0,03	200,55 ± 1,30
5	β-CD+GA (50:50)		12,86 ± 0,20	25,60 ± 0,63	199,12 ± 1,77	1,66 ± 0,05	12,92 ± 0,16	24,21 ± 0,03	188,31 ± 3,23
6	β-CD+GA (75:25)		13,53 ± 0,02	26,59 ± 1,26	196,56 ± 9,62	1,58 ± 0,03	11,65 ± 0,21	26,54 ± 0,32	196,12 ± 2,67
7	MD	1:2	8,89 ± 0,00	12,73 ± 0,27	143,25 ± 3,04	1,23 ± 0,06	13,80 ± 0,65	15,21 ± 0,10	171,16 ± 1,08
8	MD+GA (50:50)		11,83 ± 0,02	27,84 ± 0,37	235,35 ± 3,51	0,96 ± 0,00	8,10 ± 0,00	14,08 ± 0,05	119,04 ± 0,60
9	MD+GA (75:25)		11,94 ± 0,03	24,31 ± 1,55	203,64 ± 13,60	1,40 ± 0,02	11,72 ± 0,16	23,46 ± 1,17	196,45 ± 9,20
10	β-CD		8,15 ± 0,05	31,69 ± 0,50	388,56 ± 3,69	1,22 ± 0,01	14,93 ± 0,24	15,81 ± 0,33	193,83 ± 2,81
11	β-CD+GA (50:50)		8,61 ± 0,15	29,06 ± 0,78	337,81 ± 15,16	1,71 ± 0,05	19,93 ± 0,94	10,44 ± 0,49	121,35 ± 7,86
12	β-CD+GA (75:25)		6,68 ± 0,03	39,80 ± 1,28	596,00 ± 16,15	0,74 ± 0,06	11,02 ± 0,87	13,42 ± 0,29	201,05 ± 5,41
13	MD	1:3	8,32 ± 0,16	11,59 ± 0,30	139,31 ± 0,97	0,85 ± 0,03	10,25 ± 0,15	13,33 ± 0,05	160,19 ± 2,47
14	MD+GA (50:50)		10,03 ± 0,14	15,84 ± 0,17	157,81 ± 0,47	1,63 ± 0,06	16,25 ± 0,82	6,28 ± 0,03	62,55 ± 0,61
15	MD+GA (75:25)		6,97 ± 0,11	15,34 ± 0,31	220,12 ± 7,98	1,66 ± 0,04	23,86 ± 0,16	7,04 ± 0,23	101,08 ± 4,89
16	β-CD		11,12 ± 0,00	27,88 ± 0,36	250,80 ± 3,27	0,98 ± 0,00	8,83 ± 0,02	11,39 ± 0,59	102,45 ± 5,33
17	β-CD+GA (50:50)		9,42 ± 0,18	20,09 ± 0,55	213,30 ± 1,78	1,36 ± 0,01	14,43 ± 0,39	8,53 ± 0,31	90,53 ± 1,52
18	β-CD+GA (75:25)		13,76 ± 0,05	19,46 ± 0,02	141,39 ± 0,29	1,56 ± 0,01	11,33 ± 0,10	19,68 ± 0,85	143,01 ± 6,66

MD-maltodekstrin; MD + GA-kombinacija maltodekstrina i arapske gume; β-CD-β-ciklodekstrin; β-CD + GA- kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume; TE-Trolox

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta inkapsuliranih ekstrakata listova koprive početnih uzoraka i svih faza simulirane probave prikazani su u tablici 4. Antioksidacijski kapacitet određen je spektrofotometrijski FRAP metodom. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta za početni uzorak određene su u rasponu od $6,68 \pm 0,03$ do $13,76 \pm 0,05$ mmol TE 100 g^{-1} suhe tvari ekstrakta (s.tv.e.). Najviši antioksidacijski kapacitet, $13,76 \pm 0,05$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv.e., zabilježen je u uzorku čiji je nosač tijekom sušenja raspršivanjem bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. S druge strane, najniži antioksidacijski kapacitet, $6,68 \pm 0,03$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv.e., zabilježen je u uzorku u kojem je bila korištena kombinacija nosača β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača iznosio je 1:2. Nakon gastrične faze uzorak koji je imao najviši antioksidacijski kapacitet, $39,80 \pm 1,28$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv.e., bio je s nosačem kombinacije β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) u omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Najniža vrijednost zabilježena je u uzorku čiji je nosač bio maltodekstrin, s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3, u vrijednosti od $11,59 \pm 0,30$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta. Nadalje, u apsorpcijskoj fazi najviši antioksidacijski kapacitet, $1,71 \pm 0,05$ mmol TE 100 g^{-1} , imao je uzorak u kojem je nosač bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (50:50), omjera suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. S druge strane, najniža vrijednost, $0,74 \pm 0,06$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv.e., zabilježena je u uzorku čiji je nosač kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Na poslijetku, nakon provedene intestinalne faze, uzorak s najvišim antioksidacijskim kapacitetom u vrijednosti od $26,80 \pm 0,00$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv.e. bio je uzorak s nosačem u kombinaciji maltodekstrina i arapske gume u omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1. Najniža koncentracija utvrđena je u uzorku s nosačem u kombinaciji maltodekstrina i arapske gume (50:50) i omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3 u vrijednosti od $6,28 \pm 0,03$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta.

Najviši postotak antioksidacijskog kapaciteta, $596,00 \pm 16,15$ % u odnosu na početni uzorak, u gastričnoj fazi imao je uzorak čiji nosač je bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Ovom uzorku određeni je ujedno i najviši antioksidacijski kapacitet prije simulacije probave. S druge strane, najniži antioksidacijski kapacitet, $139,31 \pm 0,97$ % od početne količine, zabilježen je u uzorku čiji je nosač bio maltodekstrin u omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. U apsorpcijskoj fazi najviši postotak antioksidacijskog kapaciteta, $23,86 \pm 0,16$ % od početne količine, određen je u uzorku čiji su nosači bili maltodekstrin i arapska guma (75:25) s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. Najniži postotak antioksidacijskog kapaciteta utvrđen je u uzorku čiji je nosač bila kombinacija maltodekstina i arapske gume (50:50) s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2

u vrijednosti od $8,10 \pm 0,00$ % od početne količine. Na kraju, u intestinalnoj fazi, najviši postotak antioksidacijskog kapaciteta, $225,51 \pm 3,41$ % od početnog uzorka, određen je u uzorku čiji su nosači bili maltodekstrin i arapska guma (50:50), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1. S druge strane, najniži postotak, $62,55 \pm 0,61$ % od početne količine, utvrđen je u uzorku čiji je nosač bila kombinacija maltodekstina i arapske gume (50:50), a omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3.

Tablica 5. Analiza varijance utjecaja vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom

FRAP	N	početni uzorak (mmol TE 100 g ⁻¹ s.tv. ekstrakta)	gastroična faza %	apsorpcijska faza %	intestinalna faza %
nosač		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
MD	6	8,97 ± 0,05 ^a	167,97 ± 3,07 ^a	12,89 ± 0,18 ^b	167,12 ± 1,74 ^b
MD+GA (50:50)	6	11,25 ± 0,05 ^d	185,84 ± 3,07 ^b	12,33 ± 0,18 ^b	135,70 ± 1,74 ^a
MD+GA (75:25)	6	9,76 ± 0,05 ^b	213,03 ± 3,07 ^c	16,07 ± 0,18 ^c	160,67 ± 1,74 ^b
β-CD	6	10,14 ± 0,05 ^c	293,26 ± 3,07 ^e	12,10 ± 0,18 ^{ab}	165,61 ± 1,74 ^b
β-CD+GA (50:50)	6	10,29 ± 0,05 ^c	250,08 ± 3,07 ^d	15,76 ± 0,18 ^c	133,40 ± 1,74 ^a
β-CD+GA (75:25)	6	11,32 ± 0,05 ^d	311,32 ± 3,07 ^f	11,33 ± 0,18 ^a	180,06 ± 1,74 ^c
omjer s. tv. ekstrakt:nosač		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
1:1	12	11,58 ± 0,03 ^c	206,19 ± 2,17 ^b	12,84 ± 0,13 ^a	194,16 ± 1,23 ^c
1:2	12	9,35 ± 0,03 ^a	317,44 ± 2,17 ^c	13,25 ± 0,13 ^a	167,15 ± 1,23 ^b
1:3	12	9,94 ± 0,03 ^b	187,12 ± 2,17 ^a	14,16 ± 0,13 ^b	109,97 ± 1,23 ^a
prosječna vrijednost	36	10,29 ± 0,35	236,92 ± 18,15	13,42 ± 0,62	157,09 ± 7,73

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

*a,b,c,d,e,f – različite oznake unutar stupca odnose se na statistički značajne razlike razmatrane na razini $p \leq 0,05$ MD-maltodekstrin; MD + GA-kombinacija maltodekstrina i arapske gume; β-CD-β-ciklodekstrin; β-CD + GA-kombinacija β-ciklodekstrina i arapske gume; TE-Trolox

Analiza varijance utjecaja vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na antioksidacijski kapacitet u početnom uzorku inkapsuliranih ekstrakata koprive te u svim fazama *in vitro* probave prikazana je u tablici 5. Na temelju MANOVA analize varijance utvrđen je statistički značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj vrste nosača te omjera suhe tvari ekstrakta i nosača na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. U početnom uzorku inkapsuliranog ekstrakta koprive najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen je u uzorcima čiji su nosači tijekom sušenja raspršivanjem bili kombinacija maltodekstrina i arapske gume (50:50) te kombinacija β-

ciklodekstrina i arapske gume (75:25), dok je najniža vrijednost određena uzorcima čiji je nosač bio maltodekstrin. U gastričnoj fazi najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta zabilježena je u slučaju kada je nosač bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25), a najniža u uzorcima čiji je nosač bio maltodekstrin. Nadalje, u apsorpcijskoj fazi uzorci čiji su nosači bili kombinacija maltodekstrina i arapske gume (75:25) te kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (50:50) ostvarili su najviši antioksidacijski kapacitet. Najniža vrijednost utvrđena je u slučaju kada su nosači bili kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) te β -ciklodekstrin. Na posljepku, nakon provedene intestinalne faze uzorci s nosačem kombinacije β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) imali su najviši antioksidacijski kapacitet, a najniži kombinacija maltodekstrina i arapske gume (50:50) te kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (50:50).

Omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1 omogućio je najvišu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u početnom uzorku, a najnižu 1:2. U gastričnoj fazi uzorci s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2 posjedovali su najviši antioksidacijski kapacitet, a 1:3 najniži. U apsorpcijskoj fazi omjer 1:3 imao je višu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na preostala dva. Na kraju, u intestinalnoj fazi uzorci s omjerom suhe tvari ekstrakta i nosača 1:1 imali su najviši antioksidacijski kapacitet, a najniži s omjerom 1:3.

Na temelju analize varijance zaključeno je da su uzorci čiji je nosač bila kombinacija maltodekstrina i arapske gume u omjeru 75:25 omogućili apsorpciju sadržaja s najvećim antioksidacijskim kapacitetom u *in vitro* testu probave, dok se kao najbolji omjer suhe tvari ekstrakta i nosača pokazao 1:3.

Općenito gledajući, najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen je u gastričnoj fazi, a najniži u apsorpcijskoj. Shahidi i Peng (2018) također navode kako se antioksidacijski kapacitet povećava samo tijekom gastrične faze dok tijekom intestinalne dolazi do značajnijeg pada. Smatraju da enzimska aktivnost i pH mogu modificirati hidroksilne skupine oslobođenih fenolnih spojeva, inače glavne funkcijske skupine odgovorne za antioksidacijsku aktivnost. Donlao i Ogawa (2018) proučavali su utjecaj procesnih čimbenika na fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta zelenog čaja tijekom dvofazne *in vitro* probave. Najviši pad antioksidacijske aktivnosti svih analiziranih uzoraka također se dogodio u simuliranoj intestinalnoj fazi, a kao razlog navedena je promjena kemijske strukture fenolnih spojeva uzrokovana porastom pH vrijednosti te prisutnost slobodnih kisikovih vrsta.

Isto tako, iz analize varijance vidljivo je da se antioksidacijski kapacitet značajno povećava u gastričnoj i intestinalnoj fazi *in vitro* probave u odnosu na početni uzorak, no na kraju u

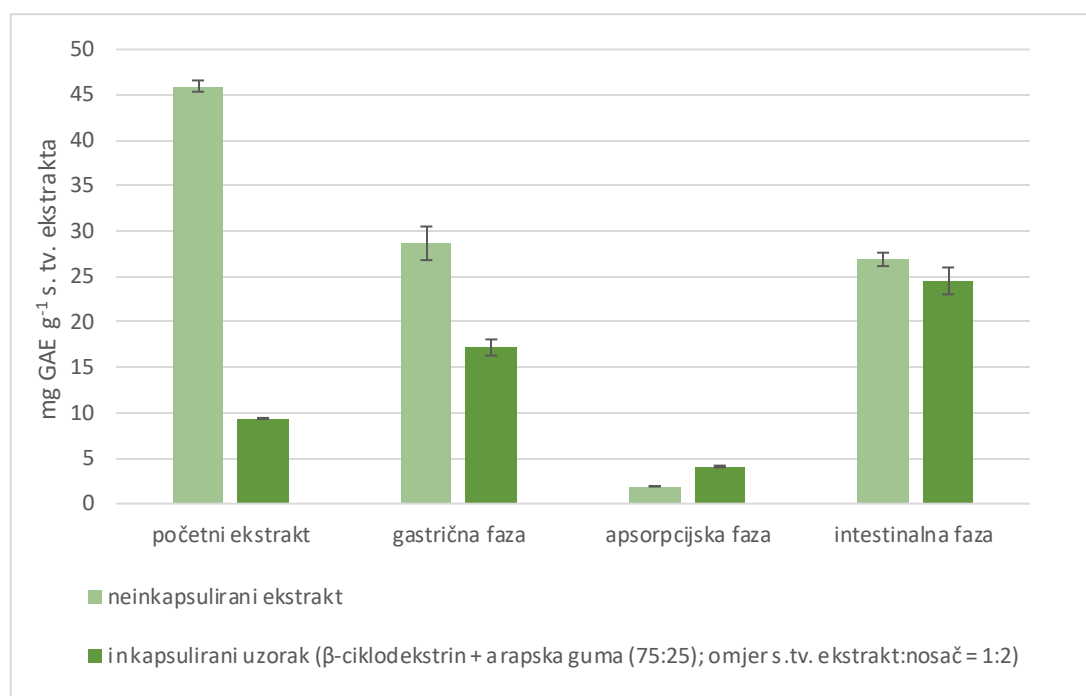
apsorpcijskoj fazi zabilježen je značajno niži antioksidacijski kapacitet zbog niske količine apsorbiranih fenolnih spojeva.

U radovima Kalajahi i Ghandiha (2022), Kaderides i sur. (2020) i Ydjedd i sur. (2017) uzorci s najvišom koncentracijom fenolnih spojeva ujedno su imali i najviši antioksidacijski kapacitet. Unatoč tome, to u ovom radu nije dokazano. Biljni ekstrakti vrlo su kompleksna mješavina različitih komponenti, a do različite antioksidacijske aktivnosti može doći zbog sinergističkog ili antagonističkog djelovanja tih komponenti (Ydjedd i sur., 2017).

Antioksidacijski kapacitet bioaktivnih spojeva jedan je od najvažnijih pokazatelja učinkovitosti inkapsulacije. U istraživanju Kalajahi i Ghandiha (2022) povećanje temperature ulaznog zraka tijekom sušenja raspršivanjem ekstrakta koprive uzrokovalo je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta. Prahovi proizvedeni pri temperaturi od 110 °C pokazali najviši antioksidacijski kapacitet, a oni pri temperaturi od 150 °C najniži. Istraživači smatraju da je to posljedica gubitka termički osjetljivih fenolnih spojeva pri višim temperaturama. S druge strane, preniske temperature sušenja mogu dovesti do ljepljive strukture prahova što vodi do smanjenja učinkovitosti inkapsulacije (Kyriakoudi i Tsimidou, 2018). Na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta utječe i trajanje samog procesa sušenja te prisutnost kisika i svjetlosti (de Souza i sur., 2018). Nadalje, na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta može utjecati i fenološka faza razvoja te područje rasta koprive. Najveći antioksidacijski kapacitet u istraživanju Repajić i sur. (2021) zabilježen je u ekstraktu listova koprive u fazi cvjetanja, a obzirom na područje rasta u uzorcima koji su ubrani u kontinentalnom i planinskom području.

U radu Igual i sur. (2014) određivao se antioksidacijski kapacitet ekstrakta tropskog voća lulo (lat. *Solanum quitoense* L.) nakon provedene inkapsulacije sušenja raspršivanjem. Utvrdilo se da se antioksidacijski kapacitet može očuvati povećanjem koncentracije nosača, točnije maltodekstrina. Maltodekstrin zbog velike molekularne mase poboljšava zadržavanje fenolnih spojeva. U ovom radu također se antioksidacijski kapacitet povećavao porastom količine nosača pa je tako najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3.

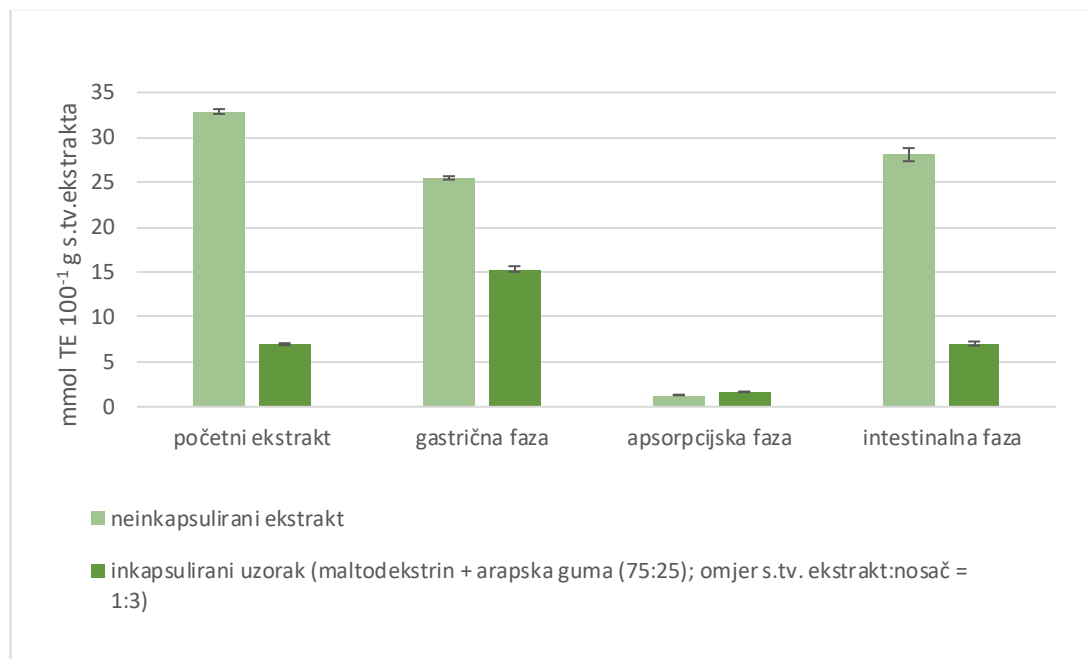
4.3. BIORASPOLOŽIVOST INKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LISTOVA KOPRIVE



Slika 10. Grafički prikaz usporedbe koncentracije fenolnih spojeva neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka najbolje apsorpcije (β -ciklodekstrin + arapska guma (75:25); omjer s.tv. ekstrakt:nosač = 1:2)

Na slici 10 prikazana je usporedba koncentracija fenolnih spojeva neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka za koji je određeno da se najbolje apsorbirao u *in vitro* testu probave. Na temelju MANOVA analize varijance utvrđeno je da je to uzorak čiji je nosač bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) u omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Iz grafičkog prikaza može se uočiti da je bioraspoloživost fenolnih spojeva inkapsuliranog uzorka viša u odnosu na neinkapsulirani ekstrakt. Ukoliko se uspoređuje koncentracija fenolnih spojeva početnog ekstrakta u odnosu na koncentraciju apsorbiranih vidljiva je znatno veća apsorpcija fenolnih spojeva inkapsuliranog uzorka u odnosu na neinkapsulirani ekstrakt. Koncentracija fenolnih spojeva početnog inkapsuliranog ekstrakta iznosila je $9,38 \pm 0,06$ mg GAE g⁻¹ s.tv. ekstrakta, a u testu *in vitro* probave apsorbiralo se $4,09 \pm 0,1$ mg GAE g⁻¹ s.tv. ekstrakta, tj. 43,60 %. S druge strane, koncentracija fenolnih spojeva početnog neinkapsuliranog ekstrakta iznosila je $45,97 \pm 0,62$ mg GAE g⁻¹ s.tv. ekstrakta, a apsorbiralo se svega $1,91 \pm 0,03$ mg GAE g⁻¹ s.tv. ekstrakta, tj. 4,15 %.

Da bi se istražila potpuna bioraspoloživost fenolnih spojeva, potrebno bi bilo još simulirati probavu u debelom crijevu jer je u radovima Grgić i sur. (2020) te Bonetti i sur. (2016) zaključeno da se najviša koncentracija fenolnih spojeva apsorbira u debelom crijevu. Nadalje, Bohn i sur. (2018) uspoređivali su probavljivost fenolnih spojeva u *in vitro* i *in vivo* testovima probave pri čemu su zaključili da ukoliko se u *in vitro* modelima probave ne simulira fermentacija u debelom crijevu, rezultati testa bioraspoloživosti nisu potpuni. Izuzetak su bili spojevi koji se gotovo u potpunosti apsorbiraju u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava kao što su na primjer neki flavonoidi. Uz to, utvrdili su da se ukupni rezultati bioraspoloživosti fenolnih spojeva *in vitro* i *in vivo* testova relativno dobro podudaraju, osobito oni koji se odnose na probavu u debelom crijevu.



Slika 11. Grafički prikaz usporedbe antioksidacijskog kapaciteta neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka najvećeg antioksidacijskog kapaciteta (maltodekstrin + arapska guma (75:25); omjer s.tv. ekstrakt:nosač = 1:3)

Na slici 11 prikazana je usporedba antioksidacijskog kapaciteta neinkapsuliranog ekstrakta i inkapsuliranog uzorka koji je imao najviši antioksidacijski kapacitet tijekom *in vitro* probave. Prema MANOVA analizi varijance, to je uzorak čiji je nosač tijekom sušenja raspršivanjem bila kombinacija maltodekstrina i arapske gume (75:25) u omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3. Ukoliko se uspoređuju vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta početnog ekstrakta i

apsorpcijske faze može se uočiti da je antioksidacijski kapacitet značajno očuvan kod inkapsuliranog uzorka u odnosu na neinkapsulirani ekstrakt. Vrijednost antioksidacijskog kapaciteta početnog inkapsuliranog ekstrakta iznosila je $6,97 \pm 0,11$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta, a u apsorpcijskoj fazi $1,66 \pm 0,04$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta. S druge strane, vrijednost antioksidacijskog kapaciteta početnog neinkapsuliranog ekstrakta iznosila je $32,87 \pm 0,27$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta, a u apsorpcijskoj fazi $1,31 \pm 0,04$ mmol TE 100 g^{-1} s.tv. ekstrakta. Iz navedenog se može zaključiti da je antioksidacijski kapacitet najboljeg inkapsuliranog uzorka u apsorpcijskoj fazi iznosio 23,82 %, a kod neinkapsuliranog ekstrakta 3,99 %.

Bonetti i sur. (2016) istraživali su bioraspoloživost inkapsuliranog ekstrakta koprive testom *in vitro* probave. Inkapsulati ekstrakta koprive dodavali su se u tjesteninu što je u konačnici uzrokovalo značajno povećanje funkcionalnosti proizvoda. U gornjem gastrointestinalnom traktu biodostupnost istraživanih fenolnih spojeva, estera kafeinske kiseline i rutina, bila je niska, a do postupnog povećanja došlo je prelaskom u debelo crijevo. Uz to, dokazano je da hrana koja sadrži ekstrakt koprive doprinosi stvaranju antioksidacijske zaštite od superoksid radikala u gastrointestinalnom traktu.

U istraživanju Zokti i sur. (2016) rezultati *in vitro* testa dokazuju da inkapsulacija provedena sušenjem raspršivanjem adekvatno štiti fenolne spojeve ekstrakta zelenog čaja te su oni u takvom obliku biodostupniji i stabilniji za apsorpciju u crijevima. Isto tako, Kyriakoudi i Tsimidou (2018) dokazali su povećanje biodostupnosti inkapsuliranih tvari krokina i pikrokrocina iz ekstrakta šafrana tijekom *in vitro* testa probave. Biodostupnost krokina povećala se s 60 % na 71,9 %, a pikrokrocina s 70 % na 80,7 %. Tijekom sušenja raspršivanjem korišteni je nosač maltodekstrin, a omjer jezgre i nosača iznosio je 1:20.

Inkapsulacija u prvom koraku povećava biodostupnost, a u drugom bioraspoloživost fenolnih spojeva. Povećanjem apsorpcije povećava se i njihova biološka aktivnost. Jedan od najvažnijih čimbenika za ostvarivanje visoke bioraspoloživosti fenolnih spojeva je stupanj polimerizacije te reakcija metilacije. Fenolni spojevi uglavnom se apsorbiraju pasivnom diuzijom pri čemu je lipofilnost i molekulska masa svake molekule ključna. Osim toga, na proces probave i apsorpciju fenolnih spojeva može utjecati prisutnost ostalih makromolekula hrane te sastav probavne mikroflore (Ozkan i sur., 2020). U istraživanju Bitsch i sur. (2004) dokazano je da se biodostupnost antocijana povećava pri višim koncentracijama glukoze i inzulina. Razlog sinergističkog odnosa između glukoze i fenolnih spojeva leži u činjenici da bakterije probavnog sustava koriste glukozu za rast, a povećanjem broja bakterija raste mogućnost modifikacija i apsorpcije fenolnih spojeva. Nadalje, visok sadržaj glukoze potiče

oslobađanje inzulina koji također pozitivno utječe na mikrofloru i bioraspoloživost fenolnih spojeva. Isto tako, hrana bogata mastima povećava apsorpciju fenolnih spojeva. Lesser i sur. (2004) analizirali su biodostupnost kvercetina u probavnom traktu svinja pri čemu su zaključili da se apsorpcija povećava za 50 % ukoliko je kvercetin ugrađen u micelle masti.

In vitro probavom ne mogu se u potpunosti imitirati svi procesi koji se zbivaju u gastrointestinalnom traktu tijekom probave, no ona može poslužiti kao prvi korak u proučavanju stupnja probavljivosti, modifikacija i interakcija pojedinih komponenti hrane (Costa i Ahluwalia, 2019).

Inkapsulacija ima veliki potencijal za povećanje biodostupnosti i bioraspoloživosti fenolnih spojeva, no potrebno je unaprijediti *in vitro* testove kako bi se ta tvrdnja mogla u potpunosti potkrijepiti. Pretpostavlja se da će buduća znanstvena istraživanja biti usmjerena na postizanje što preciznije imitacije fizikalno-kemijskih promjena u cijelom probavnom sustavu. Uz to, potrebno je istražiti i usporediti potencijalnu bioaktivnost svakog spoja i njihovih metabolita kako bi se dobio bolji pristup u procjeni učinaka inkapsulirane bioaktivne tvari na ljudski probavni sustav i sveukupno zdravlje (Ozkan i sur., 2020).

5. ZAKLJUČCI

1. Inkapsulacija ekstrakata listova koprive imala je pozitivan utjecaj na bioraspoloživost fenolnih spojeva u *in vitro* testu probave.
2. U intestinalnoj fazi *in vitro* probave određena je najviša koncentracija fenolnih spojeva, a najniža u apsorpcijskoj fazi.
3. Najveća apsorpcija fenolnih spojeva ostvarena je u uzorcima čiji je nosač bila kombinacija β -ciklodekstrina i arapske gume (75:25) pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Koncentracija apsorbiranih fenolnih spojeva iznosila je $4,09 \pm 0,1$ mg GAE g^{-1} s.tv. ekstrakta, što je 43,60 % od početnog sadržaja.
4. Najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen je u gastričnoj, a najniži u apsorpcijskoj fazi *in vitro* testa probave.
5. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u apsorpcijskoj fazi od $1,66 \pm 0,04$ mmol TE $100 g^{-1}$ s.tv. ekstrakta određena je u ekstraktu inkapsuliranom s maltodekstrinom i arapskom gumom u omjeru 75:25 pri omjeru suhe tvari ekstrakta i nosača 1:3.
6. Pomoću *in vitro* testa probave dokazano je da se inkapsulacijom povećala bioraspoloživost fenolnih spojeva iz ekstrakta listova koprive. Iz optimalno inkapsuliranog uzorka apsorbiralo se 43,60 % fenolnih spojeva, a iz neinkapsuliranog ekstrakta 4,15 %.

6. LITERATURA

Asgarpanah J, Mohajerani R (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *J Med Plants Res* **6** (46), 5714-5719. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.540>

Barros HDFQ, Junior MRM (2019) Phenolic compound bioavailability using in vitro and in vivo models. U: Campos MRS (ured.) *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 113-126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00006-2>

Belščak-Cvitanović, A, Stojanović R, Manojlović V, Komes D, Cindrić IJ, Nedović V, i sur. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Int Food Res J* **44** (4), 1094-1101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.030>

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) *Biokemija*, 6. izd., (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb, str. 541-562.

Bitsch R, Netzel M, Frank T, Strass G, Bitsch I (2004) Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *J Biomed Biotechnol* **2004** (5), 293.

Bohn T, Carriere F, Day L, Deglaire A, Egger L, Freitas D, i sur. (2018) Correlation between *in vitro* and *in vivo* data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **58** (13), 2239-2261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>

Bonetti G, Tedeschi P, Meca G, Bertelli D, Mañes J, Brandolini V, i sur. (2016) In vitro bioaccessibility, transepithelial transport and antioxidant activity of *Urtica dioica* L. phenolic compounds in nettle based food products. *Food Funct* **7** (10), 4222-4230. <https://doi.org/10.1039/C6FO01096B>

Botelho G, Canas S, Lameiras J (2017) Development of phenolic compounds encapsulation techniques as a major challenge for food industry and for health and nutrition fields. U:

Grumezescu AM (ured.) *Nutrient delivery: Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, Academic Press, London, str. 535-586. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804304-2.00014-7>

Bourgeois C, Leclerc ÉA, Corbin C, Doussot J, Serrano V, Vanier JR, i sur. (2016) Nettle (*Urtica dioica* L.) as a source of antioxidant and anti-aging phytochemicals for cosmetic applications. *C R Chim* **19** (9), 1090-1100. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.019>

Costa J, Ahluwalia A (2019) Advances and current challenges in intestinal *in vitro* model engineering: a digest. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, 144. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00144>

de Souza VB, Thomazini M, Echalar Barrientos MA, Nalin CM, Ferro-Furtado R, Genovese MI, i sur. (2018) Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. *Food Hydrocoll* **77**, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.040>

Delfanian M, Ali Sahari M (2020) Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients, *Int Food Res J* **137**, 1-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109555>

Dhouibi R, Affes H, Salem MB, Hammami S, Sahnoun Z, Zeghal KM, i sur. (2019) Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Prog Biophys Mol Bio* **150**, 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.008>

Donlao N, Ogawa Y (2018) Impacts of processing conditions on digestive recovery of polyphenolic compounds and stability of the antioxidant activity of green tea infusion during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Lebensm Wiss Technol* **89**, 648-656. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.051>

Đurović S, Pavlić B, Šorgić S, Popov S, Savić S, Petronijević M, i sur. (2017) Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J Funct Foods* **32**, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.019>

Fang Z, Bhandari B (2010) Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends Food Sci Technol* **21** (10), 510-523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

- Gonçalves A, Estevinho BN, Rocha F (2021) Methodologies for simulation of gastrointestinal digestion of different controlled delivery systems and further uptake of encapsulated bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol* **114**, 510-520. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.007>
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A (2020) Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* **9** (10), 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
- Gunathilake KDPP, Ranaweera KKDS, Rupasinghe HPV (2018) Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food chem* **245**, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096>
- Kaderides K, Mourtzinos I, Goula AM (2020) Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chem* **310**, 125849. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125849>
- Kaewsuksaeng S (2011) Chlorophyll degradation in horticultural crops. *Walailak J Sci Technol* **8** (1), 9-19.
- Kalajahi SEM, Ghandiha S (2022) Optimization of spray drying parameters for encapsulation of Nettle (*Urtica dioica* L.) extract. *Lebensm Wiss Technol* **113149**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113149>
- Karg CA, Doppler C, Schilling C, Jakobs F, Dal Colle MC, Frey N, i sur. (2021) A yellow chlorophyll catabolite in leaves of *Urtica dioica* L.: An overlooked phytochemical that contributes to health benefits of stinging nettle. *Food Chem* **359**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129906>
- Kyriakoudi A, Tsimidou MZ (2018) Properties of encapsulated saffron extracts in maltodextrin using the Büchi B-90 nano spray-dryer. *Food Chem* **266**, 458-465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.038>
- Lattanzio V (2013) Phenolic Compounds: Introduction. *Nat Prod* **50**, 1543-1580. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57

- Lesser S, Cermak R, Wolfram S (2004) Bioavailability of Quercetin in Pigs Is Influenced by the Dietary Fat Content. *J Nutr* **134** (26), 1508–1511. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1508>
- Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J nat med* **74** (1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- McDougall G, Dobson P, Shpiro F, Smith P, Stewart D, Fyffe S (2007) Assessing bioavailability of soft fruit polyphenols in vitro. *Acta Hort* **744**, 135-148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.744.13>
- Miller DA, Ellenberger D, Gil M (2016) Spray-Drying Technology. U: Williams III R, Watts A, Miller D (ured.) *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*, Springer, Cham, str. 437-525. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42609-9_10
- Mueller D, Jung K, Winter M, Rogoll D, Melcher R, Kulozik, U, i sur. (2018) Encapsulation of anthocyanins from bilberries—Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chem* **248**, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.058>
- Nedović V, Kalusević A, Manojlović V, Lević S, Bugarski B (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci* **1**, 1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Otles S, Yalcin B (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci* **2012**, 1-12. <https://doi.org/10.1100/2012/564367>
- Ozkan G, Kostka T, Esatbeyoglu T, Capanoglu E (2020) Effects of lipid-based encapsulation on the bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Molecules* **25** (23), 5545. <https://doi.org/10.3390/molecules25235545>
- Paulauskienė A, Tarasevičienė Ž, Laukagalis V (2021) Influence of Harvesting Time on the Chemical Composition of Wild Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Plants* **10** (4), 686. <https://doi.org/10.3390/plants10040686>
- Piñón-Balderrama CI, Leyva-Porras C, Terán-Figueroa Y, Espinosa-Solís V, Álvarez-Salas C, Saavedra-Leos MZ (2020) Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. *Processes* **8** (8), 889. <https://doi.org/10.3390/pr8080889>

- Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R (2016) An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci* **13**, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Repajić M, Cegledi E, Kruk V, Pedisić S, Çınar F, Bursać Kovačević D, i sur. (2020) Accelerated Solvent extraction as a green tool for the recovery of polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes* **8** (7), 803. <https://doi.org/10.3390/pr8070803>
- Repajić M, Cegledi E, Zorić Z, Pedisić S, Elez Garofulić I, Radman S, i sur. (2021) Bioactive Compounds in Wild Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Stalks: Polyphenols and Pigments upon Seasonal and Habitat Variations. *Foods* **10** (1), 190. <https://doi.org/10.3390/foods10010190>
- Rocchetti G, Chiodelli G, Giuberti G, Lucini L (2018) Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. *Food Chem* **245**, 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.146>
- Sablania V, Bosco SJD (2018) Optimization of spray drying parameters for *Murraya koenigii* (Linn) leaves extract using response surface methodology. *Powder Technol* **335**, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.05.009>
- Shahidi F, Peng H (2018) Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *J food bioact* **4**, 11-68. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4162>
- Shishir MRI, Chen W (2017) Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci Technol* **65**, 49-67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>
- Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Singh CS, Paswan VK, Rai DC (2019) Process optimization of spray dried Jamun (*Syzygium cumini* L.) pulp powder. *Lebensm Wiss Technol* **109**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.011>

Sliepčević S (2020) Morfologija, upotreba i ljekovita svojstva koprive (*Urtica dioica* L.) (završni rad), Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Somaratne G, Ferrua MJ, Ye A, Nau F, Flourey J, Dupont D, i sur. (2020) Food material properties as determining factors in nutrient release during human gastric digestion: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60** (22), 3753-3769. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1707770>

Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N (2013) Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz* **64** (2), 79-84.

Upton R (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J Herb Med* **3** (1), 9-38. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>

Veiga M, Costa EM, Silva S, Pintado M (2020) Impact of plant extracts upon human health: A review. *Crit Rev Food* **60** (5), 873-886. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1540969>

Velderrain-Rodríguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CO, Robles-Sánchez M, i sur. (2014) Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct* **5** (2), 189-197. <https://doi.org/10.1039/C3FO60361J>

Vinceković M, Viskić M, Jurić S, Giacometti J, Bursać Kovačević D, Putnik P, i sur. (2017) Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends Food Sci Technol* **69**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.001>

Ydjedd S, Bouriche S, López-Nicolás R, Sánchez-Moya T, Frontela-Saseta C, Ros-Berruezo G, i sur. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **65** (4), 827-835. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05103>

Zhang Q, Xing B, Sun M, Zhou B, Ren G, Qin P (2020) Changes in bio-accessibility, polyphenol profile and antioxidants of quinoa and djulis sprouts during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Sci Nutr* **8** (8), 4232-4241. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1718>

Zokti JA, Sham Baharin B, Mohammed AS, Abas F (2016) Green tea leaves extract: Microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules* **21** (8), 940. <https://doi.org/10.3390/molecules21080940>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Antonija Tomšić

Vlastoručni potpis