

# Utjecaj inkapsulacije na funkcionalnost i stabilnost fenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* flos) tijekom sušenja raspršivanjem

---

Gaćina, Nikolina

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:589845>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Nikolina Gaćina

**UTJECAJ INKAPSULACIJE NA  
FUNKCIONALNOST I STABILNOST  
FENOLNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA  
CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa flos*)  
TIJEKOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

DOKTORSKI RAD – privremena verzija

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Nikolina Gaćina

**UTJECAJ INKAPSULACIJE NA  
FUNKCIONALNOST I STABILNOST  
FENOLNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA  
CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa flos*)  
TIJEKOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr.sc. Ivona Elez Garofulić, izv.prof

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Nikolina Gaćina

**THE INFLUENCE OF ENCAPSULATION ON  
THE FUNCTIONALITY AND STABILITY OF  
PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE  
EXTRACT OF PRUNUS FLOWER (*Prunus  
spinosa flos*) DURING SPRAY DRYING**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Ph.D. Ivona Elez Garofulić, Associate Professor

Zagreb, 2023.

Ovaj doktorski rad izrađen je u *Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva*, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ivone Elez Garofulić u sklopu projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (šifra projekta: hrzz 3035) voditeljice prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac.

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivona Elez Garofulić, izvanredni profesor na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

## ŽIVOTOPIS MENTORA

Izv.prof.dr.sc. Ivona Elez Garofulić, rođena je 27. lipnja 1985. godine u Šibeniku gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Diplomirala je 2009. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Prehrambeno inženjerstvo. Iste godine zaposlena je kao znanstveni novak u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Doktorski rad naziva „Optimiranje proizvodnje praha soka višnje Maraske (*Prunus cerasus* var. Marasca) primjenom sušenja raspršivanjem“ izradila je u okviru međunarodnog znanstvenog projekta „Višnja Maraska kao sastojak funkcionalne hrane“ financiranog sredstvima Europske Unije, te ga obranila u srpnju 2015. godine. Tijekom dokorskog studija, od 1.12.2012.-1.3.2013., usavršavala se na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija, u području primjene kromatografskih tehnika u karakterizaciji bioaktivnih spojeva. U zvanje izvanrednog profesora izabrana je 14.12.2022. godine.

Sudjeluje u nastavi iz više kolegija na preddiplomskom i diplomskom studiju: Kemija i tehnologija voća i povrća, Začinsko i aromatsko bilje, Biološki aktivne komponente u hrani i mehanizmi djelovanja, Prehrambene tehnologije namirnica biljnog podrijetla, Osvježavajuća bezalkoholna pića, Instrumentalne analize te Suvremene metode u kontroli kvalitete hrane. Također kao vanjski suradnik sudjeluje u izvođenju nastave na studiju Prehrambena tehnologija na Sveučilištu Sjever u okviru kolegija Tehnologija proizvoda od voća i povrća te Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatskog bilja. Tijekom svog zaposlenja bila je i članica Odbora za međunarodnu suradnju te Odbora za izdavačku djelatnost. Također je bila članica organizacijskog odbora 9. Kongresa prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista 2018.godine.

Kao suradnica je sudjelovala u realizaciji više nacionalnih i međunarodnih projekata, financiranih od strane MZOS (1 projekt), HRZZ (3 projekta), te EU fondova (3 projekta). Također je sudjelovala u provedbi BICRO stručnog tehnologijskog projekta, te u nekolicini projekata vezanih za transfer znanja i tehnologije u industriji. Suradnik je i na EU financiranom

projektu Centar izvrsnosti za Bioprospecting mora. Služila je kao gost-urednik u specijalnim izdanjima časopisa Processes te je član njihovog Topical Advisory Bord-a.

Njezin znanstveno-istraživački rad obuhvaća istraživanja vezana uz izolaciju, stabilizaciju te primjenu bioaktivnih spojeva iz voća, povrća te začinskog i aromatskog bilja. Posebno je orijentirana na primjenu novih tehnika ekstrakcije te različitih metoda inkapsulacije za očuvanje biološki aktivnih komponenti. Tijekom dosadašnjeg rada objavila je 40 znanstvenih radova (35 indeksirana A1, 5 indeksiranih A2) te 4 rada u zbornicima skupova (A3). Objavljene znanstvene publikacije citirane su 787 puta prema WoS-u (h-indeks 14). Sudjelovala je na više od 60 domaćih i međunarodnih znanstvenih konferencija. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 9 diplomskih i 8 završnih radova. Dobitnica je nagrade AgroArca za uspješno proveden projekt „Višnja maraska kao sastojak funkcionalne hrane“ 2015.godine.

Aktivno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu, te poznaje osnove talijanskog jezika.

*Veliko hvala mojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić, na strpljenju, vođenju i suradnji. Od srca također zahvaljujem prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac koja je uvijek imala toplu riječ i dala mi poticaj kad bi zapelo, te doc.dr.sc. Sandri Pedisić i izv.prof.dr.sc. Zoranu Zoriću na svojoj pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela istraživanja..*

*Najveće hvala i posveta mojim roditeljima i mojoj djeci Luciji i Dominiku, na bezuvjetnoj podršci na ovom akademskom putu.*



## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij Nutricionizam

Disertacija

**UDK:**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Nutricionizam

### **UTJECAJ INKAPSULACIJE NA FUNKCIONALNOST I STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa flos*) TIJEKOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

*Nikolina Gaćina, mag.ing.*

**Rad izrađen** je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivona Elez Garofulić

**Kratki sažetak doktorskog rada:** Cilj ovog rada bio je optimizirati uvjete inkapsulacije fenolnih spojeva cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) primjenom postupka sušenja raspršivanjem. Korišteni nosači su maltodekstrin (MD 13-17 DE), smjesa maltodekstrina i 25% arapske gume (MD+25%GA), smjesa maltodekstrina i 50% arapske gume (MD+50%GA) te smjesa maltodekstrina i 25% inulina (MD+25%IN) i smjesa maltodekstrina i 50% inulina (MD+50%IN). Ispitivan je i utjecaj omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5; 1 i 2) te temperature inkapsulacije (120, 150 i 180°C) na stabilnost fenolnih spojeva i njihov antioksidacijski kapacitet. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je određivanje ukupnih hidrosicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina, flavonola, flavanola i flavona, te ukupnih fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju, dok je antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom. Vrsta nosača je određena kao ključan faktor zadržavanja svih skupina spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine dok temperatura i omjer nosača i suhe tvari ekstrakta nisu imali značajan utjecaj. Optimalni uvjeti inkapsulacije su: nosač MD, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 te temperatura sušenja 180°C. Pri navedenim optimalnim uvjetima zadržavanje ukupnih fenolnih spojeva je iznosilo 91,24% i AOK 81,30% u odnosu na početni ekstrakt. Stoga inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima imaju visok potencijal za razvoj funkcionalnih proizvoda s poboljšanom stabilnošću fenolnih spojeva i visokom antioksidativnom aktivnošću.

**Broj stranica:** 181

**Broj slika:** 25

**Broj tablica:** 39

**Broj literaturnih navoda:** 249

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** inkapsulacija, fenolni spojevi, sušenje raspršivanjem, cvijet trnine, ORAC

**Datum obrane:** X.X.2023.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. Verica Dragović Uzelac, red.prof.
2. dr. sc. Stela Jokić, red.prof.
3. dr. sc. Martina Bituh, izv. prof.

**Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Postgraduate University Doctoral Study in Nutrition**  
**UDK:**  
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Nutrition**

**Ph.D. Thesis**

### **INFLUENCE OF ENCAPSULATION ON THE FUNCTIONALITY AND STABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLACKTHORN FLOWER (*Prunus spinosa flos*) EXTRACT DURING SPRAY DRYING**

*Nikolina Gaćina, MSC*

**Thesis performed at** Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb.  
**Supervisor:** Ph.D. Ivona Elez Garofulić, Associate Professor

**Short abstract:** This work aimed to optimize the conditions of encapsulation of phenolic compounds of blackthorn flower (*Prunus spinosa flos*) using spray drying method. Wall materials used are maltodextrin (MD 13-17 DE), a mixture of maltodextrin and 25% gum arabic (MD+25% GA), a mixture of maltodextrin and 50% gum arabic (MD+50% GA) and a mixture of maltodextrin and 25% inulin (MD+25% IN) and a mixture of maltodextrin and 50% inulin (MD+50% IN). The influence of wall material to extract dry matter ratio (0.5; 1 and 2) and the encapsulation temperature (120, 150 and 180°C) on the stability of phenolic compounds and their antioxidant capacity was also investigated. This study included the determination of total hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids, flavonols, flavanols and flavones, and total phenolic compounds using ultra-efficient liquid chromatography (UPLC) with MS/MS detection, while antioxidant capacity was determined by ORAC method. The type of wall material was determined as a key factor in the retention of all phenolic groups in encapsulated blackthorn flower extracts, while the temperature and wall material to extract dry matter ratio had no significant effect. The optimal encapsulation conditions are: MD as wall material, wall material to extract dry matter ratio of 1:1 and drying temperature of 180°C. Under the specified optimal conditions, retention of total phenolic compounds was 91.24% and AOK 81.30% compared to the initial extract. Therefore, the encapsulated blackthorn flower extracts obtained under the specified optimal conditions have a high potential for the development of functional products with improved stability of phenolic compounds and high antioxidant activity.

**Number of pages:** 181

**Number of figures:** 25

**Number of tables:** 39

**Number of references:** 249

**Original in:** Croatian

**Keywords:** encapsulation, polyphenols, spray drying, blackthorn flower, ORAC

**Date of the thesis defense:** x.x. 2023.

#### **Reviewers:**

1. Ph. D. Verica Dragović Uzelac, Full Professor
2. Ph. D. Stela Jokić, Full Professor
3. Ph. D. Martina Bituh, Associate Professor

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

## SAŽETAK

Cvijet trnine (*Prunus sponosa flos*) zbog visokog udjela fenolnih spojeva predstavlja izvrsnu sirovinu za proizvodnju biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane. Inkapsulacijom fenolnih spojeva uz primjenu adekvatnih nosača povećava se njihova stabilnost i funkcionalnost. Za proizvodnju praha ekstrakta cvijeta trnine (PECT) s visokim udjelom fenolnih spojeva i visokim antioksidacijskim kapacitetom važno je odabrati parametre sušenja tj. vrstu nosača, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturu sušenja. Stoga je u ovom istraživanju za optimizaciju uvjeta inkapsulacije fenolnih spojeva iz PECT korištena metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology* - RSM) uz simultanu optimizaciju metodom poželjnosti. Ispitano je pet vrsta nosača: maltodekstrin (MD), smjesa MD i 25% arapske gume (GA) (MD+25%GA), smjesa MD i 50% GA (MD+50%GA), smjesa MD i 25% inulina (IN) (MD+25%IN) te smjesa MD i 50% IN (MD+50%IN) pri različitim omjerima prema suhoj tvari ekstrakta (0,5; 1 i 2) te pri temperaturama sušenja 120, 150 i 180°C. Ovisno o primijenjenoj temperaturi sušenja i udjelu nosača, sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine je značajno varirao, pri čemu je uočen trend smanjenja pri višim udjelima nosača i višoj temperaturi sušenja, bez obzira na vrstu nosača. Pri svim uvjetima sušenja, neovisno o vrsti nosača, sastav fenolnih spojeva u PECT je bio isti te je identificirano ukupno 30 fenolnih spojeva. Analizirane su ukupne hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline, flavonoli, flavanoli i flavoni te ukupni fenolni spojevi primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju, dok je antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom. Ključan faktor zadržavanja svih skupina spojeva u PECT je bila vrsta primijenjenog nosača, dok temperatura i omjer nosača i suhe tvari ekstrakta nisu imali značajan utjecaj. Na temelju maksimalnog zadržavanja svih skupina fenolnih spojeva te antioksidacijskog kapaciteta su utvrđeni optimalni uvjeti inkapsulacije ekstrakta cvijeta trnine sušenjem raspršivanjem kako slijedi: primjena čistog MD kao nosača, u omjeru 1:1 prema suhoj tvari ekstrakta pri sušenju od 180°C. Pri tom je zadržavanje ukupnih fenolnih spojeva iznosilo 91,24%, a antioksidacijski kapacitet 81,30% u odnosu na početni ekstrakt. Stoga se inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima mogu smatrati vrijednom sirovinom s visokim potencijalom primjene u razvoju funkcionalnih proizvoda.

**Ključne riječi:** ekstrakt cvijeta trnine, inkapsulacija, sušenje raspršivanjem, maltodekstrin, arapska guma, inulin, optimizacija, RSM, fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet, ORAC

## EXTENDED ABSTRACT

*Prunus spinosa* L., blackthorn or thorn is a widespread wild plant from the genus *Prunus*, almost all parts of which, including the flowers (*Prunus spinosa flos*), have been used for centuries in folk medicine due to the significant presence of biologically active compounds. Most of the scientific research so far has been focused on determining the composition and mass fractions of biologically active compounds in the blackthorn fruits and leaves, and to a lesser extent in the flower. Among the biologically active compounds of blackthorn flower, the most important place is occupied by phenolic compounds. The stability of phenols is affected by numerous factors such as oxygen, light, moisture, temperature and changes in pH value, which results in a reduction of their biological activity or its complete loss during various processing procedures into semi-finished and finished functional products and also during extraction. The most commonly applied methods of stabilizing phenolic compounds are encapsulation methods, i.e. their incorporation into protective wall materials. The encapsulation of sensitive biologically active compounds increases their stability and possibility of application, therefore the selection of the encapsulation material (wall material) and the encapsulation method itself is very important. One of the more effective methods of microencapsulation of phenolic compounds is the spray drying method, which converts phenolic compounds from various extracts into a more stable powder form. The advantages of encapsulation using the spray drying method are a relatively low temperature of the product in relation to the high temperature of the inlet air and a short duration of the process due to the large surface area for mass and heat transfer, the stability of the encapsulated biologically active compounds and easy applicability on an industrial level. The aim of this research was to determine the conditions under which the highest stability and retention of phenolic compounds and antioxidant capacity are achieved in the encapsulated blackthorn flower extract obtained by spray drying. For this purpose, the encapsulation of the phenolic compounds of the blackthorn flower was carried out using the spray drying process, the phenolic compounds were quantified and identified by the UPLC-MS/MS method, and the antioxidant capacity of the obtained encapsulates was determined by the ORAC method, as there is no literature reports on ORAC value of blackthorn flower.

The efficiency of the encapsulation of phenolic compounds from the blackthorn flower was investigated through the influence of three parameters: the type of wall material, wall material to extract dry matter ratio (0.5, 1 and 2) and the drying temperature (140, 160 and 180°C).

The following were used as wall materials during spray-drying encapsulation: maltodextrin (MD), a mixture of MD and 25% gum arabic (GA), i.e. MD+25%GA, a mixture of MD+50%GA, a mixture of MD and 25% inulin (IN) and a mixture MD+50%IN. To optimize the encapsulation efficiency of phenolic compounds, the response surface method was used with regard to the type of wall material, wall material to extract dry matter ratio and the drying temperature as independent variables. Simultaneous optimization was also carried out using the desirability method for the encapsulation of total hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, total flavonols, flavanols and flavones, and total phenolic compounds and their antioxidant capacity, i.e. ORAC values, as well as the conditions for simultaneous optimization of total phenolic compounds and their antioxidant capacity expressed as ORAC values.

The basic hypotheses of the research were: the type of wall material, wall material to extract dry matter ratio, and the drying temperature will affect the stability and retention of phenolic compounds during the encapsulation of blackthorn flower extract; the qualitative composition of phenolic compounds in liquid extracts and powders will be the same or similar, and the mass fractions and mutual relations of phenolic compounds will differ depending on the applied encapsulation conditions; encapsulated blackthorn flower extracts with a higher proportion of phenolic compounds will have a higher antioxidant capacity.

The moisture content in the encapsulated blackthorn flower extracts significantly depended on the applied drying temperature and the proportion of the wall material, showing a decreasing trend at higher proportions of the wall material and higher drying temperature, regardless of the type of wall material. A total of 30 phenolic compounds were identified using the UPLC-MS/MS method, including one hydroxybenzoic acid (UHBK), nine hydroxycinnamic acids (UHCK), 15 flavonols (UFLO), four flavanols (UFLA) and one flavone (UFL). The composition of phenolic compounds in PECT remained the same across all drying conditions, regardless of the type and ratio of wall material. Flavonols (61%) and hydroxycinnamic acids (35%) were the most abundant group of phenolic compounds, followed by flavanols, flavones, and hydroxybenzoic acid in descending order. The wall material type was identified as a crucial factor for retaining all compound groups in the encapsulated extracts, whereas the temperature and wall material to extract dry matter ratio showed no significant effect. The use of pure MD as a wall material without the addition of GA and IN was found to be the most effective for encapsulating most of the observed phenolic groups, including UHCK, UFLO, UFLA, and UFL. The addition of 25% GA to the wall material mixture had a slightly lower efficiency for these compounds, except for UFL, where a positive influence on the

achieved concentration was observed. However, for UHBK, a better retention trend was observed in extracts encapsulated with a higher proportion of GA (MD+50% GA). The type of wall material used significantly influenced the antioxidant capacity of the encapsulated extracts, with the greatest values observed in extracts encapsulated with pure MD. Incorporating GA into the wall material mixture had an adverse impact on the antioxidant capacity of the encapsulated extracts, while not affecting the phenolic compound content. On the other hand, the addition of IN had a negative impact on both the concentration of phenolic compounds and the related antioxidant activity. Through the optimization of encapsulation conditions to produce a final product with a high retention of phenolic compounds and antioxidant capacity, optimal conditions for blackthorn flower extract spray drying encapsulation were established as follows: pure MD as the wall material, a carrier-to-extract dry matter ratio of 1:1, and a drying temperature of 180°C. The optimized spray drying encapsulation conditions resulted in a remarkably high retention rate of phenolic compounds, with 91.24% retention, and a corresponding antioxidant capacity of 81.30% when compared to the original blackthorn flower extract.

This research represents a significant contribution in the field of nutrition due to the determination of the parameters of the maximum retention efficiency of phenolic compounds in blackthorn flower extracts obtained by the spray drying method. The obtained powders, rich in phenolic compounds, way will represent an excellent base for expanding the range of functional products based on blackthorn flower, as well as other parts of the same plant.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. Trnina ( <i>Prunus spinosa</i> L.).....	4
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke .....	4
2.1.2. Kemijski sastav cvijeta trnine.....	6
2.2. Fenolni spojevi cvijeta trnine .....	7
2.2.1. Fenolne kiseline cvijeta trnine.....	8
2.2.2. Flavonoidi cvijeta trnine.....	10
2.2.2.1. Flavonoli i flavonol glikozidi cvijeta trnine .....	11
2.2.2.2. Flavanoli cvijeta trnine.....	13
2.2.2.3. Flavoni cvijeta trnine .....	15
2.2.3. Tradicionalna upotreba cvijeta trnine i zdravstveni benefiti fenolnih spojeva cvijeta trnine na zdravlje čovjeka.....	16
2.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	18
2.3. Inkapsulacija fenolnih spojeva .....	21
2.4. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem .....	23
2.4.1. Nosači za inkapsulaciju fenolnih spojeva metodom sušenja raspršivanjem .....	26
2.5. Mogućnost primjene tekućih i inkapsuliranih ekstrakata cvijeta trnine i buduće perspektive .....	33
<b>2. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>39</b>
3.1. Materijali .....	40
3.1.1. Biljni materijal.....	40
3.1.2. Kemikalije i reagensi .....	40
3.1.3. Aparatura i pribor .....	42
3.2. Metode.....	45
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva cvijeta trnine ( <i>Prunus spinosa flos</i> ) .....	45
3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari u početnom ekstraktu cvijeta trnine ( <i>Prunus spinosa flos</i> ) i sadržaja vlage u inkapsuliranim ekstraktima .....	46

3.2.3. Inkapsulacija fenolnih spojeva vodenog ekstrakta cvijeta trnine ( <i>Prunus spinosa flos</i> ) metodom sušenja raspršivanjem.....	47
3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine ( <i>Prunus spinosa flos</i> ).....	51
3.2.5. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine ( <i>Prunus spinosa flos</i> ) primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju.....	52
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (AOK) ekstrakata cvijeta trnine ORAC metodom.....	55
3.3. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka.....	56
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>57</b>
4.1. Rezultati određivanja sadržaja vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	58
4.2. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine.....	61
4.3. Rezultati kromatografskog određivanja sadržaja i sastava fenolnih spojeva ekstrakta cvijeta trnine.....	65
4.4. Rezultati određivanja ukupnih hidroksibenzojevih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	67
4.5. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih hidroksibenzojevih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine.....	70
4.6. Rezultati određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine.....	74
4.7. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine.....	79
4.8. Rezultati određivanja ukupnih flavonola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine	83
4.9. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavonola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	88



4.10.	Rezultati određivanja ukupnih flavanola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine	92
4.11.	Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavanola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	95
4.12.	Rezultati određivanja ukupnih flavona u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine	99
4.13.	Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavona u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	102
4.14.	Rezultati određivanja ukupnih fenolnih spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	106
4.15.	Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine	109
4.16.	Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	113
4.17.	Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na AOK mjeren ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine..	116
4.18.	Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i pripadajuće ORAC vrijednosti u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	120
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>122</b>
5.1.	Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine .....	124
5.2.	Profil fenolnih spojeva inkapsuliranih ekstrakata cvijeta trnine .....	127
5.2.1.	Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju hidroksibenzojevih kiselina u prahu ekstrakta cvijeta trnine .....	129
5.2.2.	Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju hidroksicimetnih kiselina u prahu ekstrakta cvijeta trnine .....	131

5.2.3. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavonola praha ekstrakta cvijeta trnine.....	134
5.2.4. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavanola praha ekstrakta cvijeta trnine.....	136
5.2.5. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavona cvijeta trnine.....	138
5.2.6. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva cvijeta trnine .....	140
5.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta cvijeta trnine .....	142
5.4. Simultana optimizacija ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta inkapsuliranom ekstraktu cvijeta trnine .....	145
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>147</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>150</b>

# **1. UVOD**

*Prunus spinosa* L., crni trn ili trnina je široko rasprostranjena divlja biljka iz roda *Prunus*, čiji se gotovo svi dijelovi, pa tako i cvjetovi (*Prunus spinosa flos*), koriste stoljećima za pripremu ljekovitih pripravka u narodnoj medicini zbog značajne prisutnosti biološki aktivnih spojeva. Većina dosadašnjih znanstvenih istraživanja su bila usmjerena na određivanje sastava i masenih udjela biološki aktivnih spojeva u plodovima i listu trnina, te manjim dijelom u cvijetu trnina. Među biološki aktivnim spojevima cvijeta trnina najznačajnije mjesto zauzimaju fenolni spojevi.

Na stabilnost fenolnih utječu brojni faktori poput kisika, svjetlosti, vlage, temperature i promjene pH vrijednosti, što rezultira smanjenjem njihove biološke aktivnosti ili njenim potpunim gubitkom tijekom različitih postupaka prerade u poluproizvode i gotove funkcionalne proizvode te također tijekom provođenja ekstrakcije. Najčešće primjenjivane metode stabilizacije fenolnih spojeva su metode inkapsulacije tj. njihova ugradnja u zaštitne nosače. Inkapsulacijom osjetljivih biološki aktivnih spojeva (BAS) povećava se njihova stabilnost i mogućnost primjene, stoga je vrlo bitan odabir inkapsulacijskog materijala (nosača) i same metode inkapsulacije. Jedna od učinkovitijih metoda mikroinkapsulacije fenolnih spojeva je metoda sušenja raspršivanjem kojom se fenolni spojevi iz različitih ekstrakata prevode u stabilniju formu praha. Prednosti inkapsulacije metodom sušenja raspršivanjem su relativno niska temperatura proizvoda u odnosu na visoku temperaturu ulaznog zraka i kratko vrijeme trajanja procesa zbog velike površine izmjene tvari i topline, stabilnost inkapsuliranih biološki aktivnih spojeva i laka primjenjivost na industrijskoj razini.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi uvjete pri kojima se postiže najveća stabilnost i zadržavanje fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet u inkapsuliranom ekstraktu cvijeta trnina dobivenom sušenjem raspršivanjem. U tu svrhu provedena je inkapsulacija fenolnih spojeva cvijeta trnina primjenom postupka sušenja raspršivanjem, utjecaj primijenjenih uvjeta sušenja na zadržavanje fenolnih spojeva koji su kvantificirani i identificirani primjenom UPLC-MS/MS metodom te utjecaj na antioksidacijski kapacitet dobivenih inkapsulata ORAC metodom, što do sad za cvijet trnina nije dokumentirano u znanstvenoj literaturi.

Kao nosači prilikom inkapsulacije sušenjem raspršivanjem korišteni su: maltodekstrin (MD), mješavina MD i 25% arapske gume (GA) tj. MD + 25% GA, mješavina MD + 50% GA, mješavina MD i 25% inulina (IN) te mješavina MD + 50% IN. Efikasnost inkapsulacije fenolnih spojeva iz cvijeta trnina ispitivana je kroz utjecaj tri parametra: vrste nosača, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0.5, 1 i 2) i temperature sušenja (140, 160 i 180°C).

Za optimizaciju učinkovitosti inkapsulacije fenolnih spojeva korištena je metoda odzivnih površina s obzirom na vrstu nosača, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta, te temperaturu sušenja kao neovisnih varijabli. Također je provedena i istodobna optimizacija metodom poželjnosti za inkapsulaciju ukupnih hidroksibenzojevih i hidroksicimentnih kiselina, ukupnih flavonola, flavanola i flavona, te ukupnih fenolnih spojeva i njihovog antioksidacijskog kapaciteta tj. ORAC vrijednosti, kao i uvjeti istovremene optimizacije ukupnih fenolnih spojeva i njihovog antioksidacijskog kapaciteta izraženog ORAC vrijednostima.

Osnovne hipoteze istraživanja bile su: (i) vrsta nosača, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta te temperatura sušenja će utjecati na stabilnost i zadržavanje fenolnih spojeva tijekom inkapsulacije ekstrakta cvijeta trnine; (ii) kvalitativni sastav fenolnih spojeva u tekućim ekstraktima i prahovima će biti isti ili sličan, a maseni udjeli i međusobni odnosi fenolnih spojeva će se razlikovati ovisno o primjenjenim uvjetima inkapsulacije; inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine s većim udjelom fenolnih spojeva će imati veći antioksidacijski kapacitet.

Ovo istraživanje predstavlja značajan doprinos u području nutricionizma zbog utvrđivanja parametara maksimalne efikasnosti zadržavanja fenolnih spojeva u prahovima ekstrakata cvijeta trnine dobivenih metodom sušenja raspršivanjem. Ovako dobiveni prahovi bogati fenolnim spojevima predstavljati će izvrsnu bazu za proširenje asortimana funkcionalnih proizvoda na bazi cvijeta trnine, kao i ostalih dijelova iste biljke.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Trnina (*Prunus spinosa* L.)

Trnina (engl. *blackthorn* – biljka, *sloe* – plod; fran. *épine noire*, *prunellier*, *prunier*; španj. *Ciruelo Silvestre*, *Endrino*, *Espino Negro*) ili crni trn, trnina, *trnjula* (Šugar i sur., 2002), *trnavka*, *divlja šljiva*, *mačja šljiva*, *grmulja*, *kukinja* je ljekovita samonikla vrsta roda *Prunus* koja se koristila u narodnoj medicini različitih nacija od davnina. Prema tradicionalnoj botaničkoj klasifikaciji pripada u više biljke ili stablašice (*Cormaphyta*), odjeljak sjemenjača (*Spermatophyta*), pododjeljak kritosjemanjača (*Magnoliophyta*), razred dvosupnica (*Magnoliata*), podrazred Rosade (*Rosiflorae*), nadred *Rosanae*, redu *Rosales*, porodici ruža (*Rosaceae*), potporodica *Prunideae*, rod *Prunus* (Hulina, 2011).

### 2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

*Prunus spinosa* L. je autohtona samonikla divlja vrsta široko rasprostranjena u gotovo svim dijelovima Europe, Turske, Irana i Kavkaza, odakle je prenesena na Novi Zeland, sjeverozapadnu Afriku i istok Sjeverne Amerike. U Republici Hrvatskoj trnina je rasprostranjena u listopadnim šumama, šikarama i pašnjacima, a raste i na suhim i sunčanim obroncima Velebita, među drugim grmljem i uz rub šume, od obalnog područja do viših gorskih položaja, u rasponu nadmorske visine od 3 do 1 000 m (Forenbacher, 2001).

Trnina je razgranat listopadni grm raspona od 1 do 4 m i u pogodnim klimatskim uvjetima može narasti i do 5 metara u visinu (Kavaz Yuksel, 2015). Stablo ima vijek trajanja oko 40 godina, heliofilna je vrsta i može rasti u različitim vrstama tla. Svi dijelovi biljke su ljekoviti, a naročito plodovi, listovi, kora i cvjetovi.

Nezreli plodovi trnine su zeleni i vrlo gorkog okusa, te dozrijevanjem dobivaju crnomodru boju i slatko-kiselu aromu. Plodovi trnine su kuglasti i mesnati s košticom, promjera 1 – 1,5 cm. Zbog intenzivno trpkog do gorkog okusa najčešće se prerađuju u džem, sok i u ljekovite digestivne i probavne likere (Barros i sur., 2010).

Listovi su ovalna oblika, nazubljena ruba s obraslim finim dlačicama, izmjenični ili skupljeni u čuperke. Duljina lista je 2 - 6 cm, širina 1 - 3 cm i imaju peteljku dugu do 1 cm.

Kora stabla trnina u početku je crveno-smeđa i baršunasta, a kasnije postaje tamno siva i dobiva blage utore.

Cvjetovi trnina su bijele boje, promjera 1,5 cm, sadrže 5 latica, najčešće su pojedinačni ili rjeđe grupirani 2 – 3 cvijeta zajedno, na kratkim stapkama (Slika 1). Cvjetovi se pojavljuju prije listanja u ožujku ili travnju (Hulina, 2011), masovno cvjetaju na temperaturi od 10-15 °C (Levon i Golubkova, 2019) dvospolni su, jednodomni, sadrže 20 prašnika dugih oko 0,5 cm sa žutim prašnicima i tankim bijelim prašničkim nitima koje oprašuju kukci (Idžojtić, 2013).



**Slika 1.** Otto Wilhelm Thome (1885) - Ilustracija cvijeta, ploda, sjemenke i lišća trnina (Wikimedia Commons, 2006)



### 2.1.2. Kemijski sastav cvijeta trnine

Među bioaktivnim molekulama cvijeta trnine značajno mjesto zauzimaju fenolni spojevi (Elez Garofulić i sur., 2018; Lovrić i sur., 2017; Marchelak i sur., 2017). Iz ove kompleksne i široko rasprostranjene skupine BAS u cvijetu trnine su najzastupljeniji kamferol, kvercetin i njihovi glikozidi (najčešće arabinoze, ksiloze i ramnoze) (Elez Garofulić i sur., 2018; Irizar i sur., 1992; Marchelak i sur., 2017; Sakar i Kolodziej, 1993), proantocijanidin tipa A i fenolne kiseline (Elez Garofulić i sur., 2018; Gonzalez i sur., 1992; Marchelak i sur., 2017) od kojih je najzastupljenija *p*-hidroksibenzojeva kiselina (Olszewska i Wolbis, 2000). Olszewska i sur. (2001a) dokumentirali su da je omjer kamferola i kvercetina u cvjetovima trnine sa područja Poljske 1:1.

Dokazani su antioksidacijski i antitumorski učinci dvaju glavnih komponenata ekstrakta cvijeta trnine, kvercetina (Salehi i sur., 2020) i kamferola (Imran i sur., 2019).

Novija istraživanja koja su provedena na cvijetu trnine sakupljene na području Republike Hrvatske također potvrđuju prisutnost visokog udjela fenolnih spojeva. Lovrić i sur. (2017) su istraživali utjecaj parametara mikrovalne ekstrakcije (odabir otapala, koncentracije otapala, vrijeme trajanja ekstrakcije i temperature ekstrakcije) na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavona, te su odredili antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata DPPH i FRAP metodama. Ekstrakti dobiveni sa 70% otopinom etanola sadržavali su više fenolnih spojeva, ali su ekstrakti dobiveni sa 50% otopinom metanola pokazivali veći antioksidacijski kapacitet. Viša temperatura ekstrakcije (60°C) je pozitivno utjecala na povećanje sadržaja fenolnih spojeva u ekstraktima kao i na njihov antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom. Duža izloženost mikrovalnoj ekstrakciji (15-25 min) imala je značajan utjecaj samo na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, dok je 5 minutno trajanje mikrovalne ekstrakcije bilo povoljnije za sadržaj pojedinačnih fenolnih skupina i vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata. Elez Garofulić i sur. (2018) su UPLC-MS<sup>2</sup> metodom identificirali i kvantificirali 28 fenolnih spojeva iz etanolnih ekstrakata cvijeta trnine dobivenih ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom, od kojih su najzastupljeniji bili glikozidi kamferola tj. kamferol pentozid (494.94 mg/100g) i kamferol ramnozid (436.62 mg/100g), te kvercetin pentozid (226.75 mg/100g).

Osim fenolnih spojeva u cvijetu trnine izolirani su i triterpeni  $\alpha$ -amirin i  $\beta$ -amirin, od kojih je  $\alpha$ -amirin dominantno prisutan (Wolbiś i sur., 2001). Od terpena je izdvojena smjesa

slobodnih sterola ( $\beta$ -sitosterol,  $\gamma$ -sitosterol i stigmasterol), a među izoliranim spojevima prevladavao je  $\beta$ -sitosterol (Wolbiś i sur., 2001).

## 2.2. Fenolni spojevi cvijeta trnine

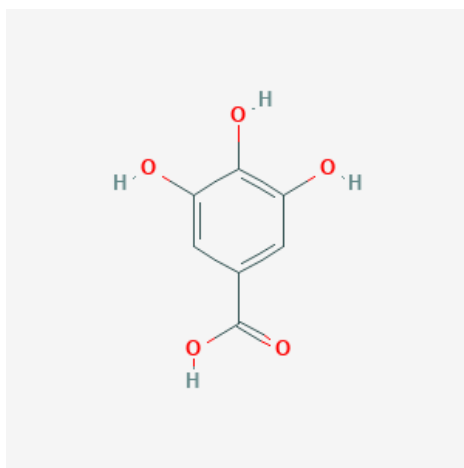
Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti čija je kemijska raznolikost specifična za svaku vrstu. U mnogobrojnim biljnim vrstama te njihovim dijelovima zastupljene su strukturno različite skupine spojeva u različitim udjelima i međusobnim omjerima. Osim što imaju strukturnu funkciju u biljkama, sudjeluju u njihovom obrambenom sustavu i prilagodbi na okolišne uvjete. Stoga vrsta uzgoja, izloženost suncu, količina padalina kao i geografski čimbenici (geografska širina i nadmorska visina) utječu na sadržaj fenolnih spojeva u biljkama (Moreira i sur. 2018; Visioli i sur., 2011). Široko se distribuiraju u biljnim tkivima (cvijeću, sjemenkama, korijenu i jestivim dijelovima) gdje uglavnom postoje u obliku glikozida. Do danas identificirano više od 10 000 prirodnih fenolnih spojeva (Rasouli i sur., 2017) što ih klasificira na treće mjesto najrasprostranjenih BAS u biljkama. Razlikuju se po strukturi, od najjednostavnijih koji se sastoje od hidroksiliranog aromatskog prstena do kompleksnih tj. visoko polimeriziranih spojeva. Najjednostavnija podjela fenolnih spojeva je na neflavonoide, čiji su glavni predstavnici fenolne kiseline i flavonoide (Singla i sur., 2019).

S obzirom na činjenicu da fenolni spojevi utječu na poboljšanje ljudskog zdravlja, prevenirajući nastanak pojedinih bolesti i/ili potpomažući njihovo liječenje, uključujući njihova antioksidativna, protuuplana, protutumorska i antimikrobna svojstva, predmet su brojnih znanstvenih istraživanja (Rocchetti i sur., 2022). Unatoč brojnim istraživanjima još uvijek postoje oprečna mišljenja o kratkoročnim i dugoročnim učincima fenolnih spojeva na zdravlje kao i mehanizama djelovanja. Posljedično, u zadnjih 20 godina istraživanja vezana za izolaciju fenolnih spojeva iz biljaka, identifikaciju i kvantifikaciju u stalnom su porastu.

### 2.2.1. Fenolne kiseline cvijeta trnine

Fenolne kiseline su najzastupljeniji neflavonoidi koji se s obzirom na strukturnu specifičnost dijele se u dvije osnovne skupine: hidroksicimetne kiseline ( $C_6-C_3$ ) i hidroksibenzojeve kiseline ( $C_6-C_1$ ) i njihove derivate. Razlike u strukturi između pojedinih hidroksicimetnih ili hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, te najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima i kao esteri. Najpoznatiji ester je 5'-kafeoilkina kiselina poznata po trivijalnom nazivu kao klorogenska kiselina.

Hidroksibenzojeve kiseline su prisutne u svim biljkama, a naročito u voću niže pH vrijednosti. U posljednjih 10 godina pronađeno je najmanje 30 derivata hidroksibenzojevih i polihidroksibenzojevih kiselina u biljnim ekstraktima (Khadem i Marles, 2010). Galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokateinska i vanilinska kiselina najčešće su hidroksibenzojeve kiseline. Galna kiselina (Slika 2) se često nalazi u kompleksom obliku sa drugim fenolnim spojevima npr. kao epikatehin galat. Galna kiselina ima tri puta veći antioksidacijski kapacitet od vitamina C ili vitamin E (Rice-Evans i sur., 1997).

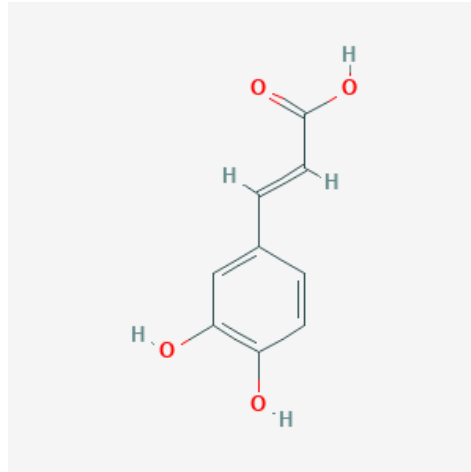


**Slika 2.** Kemijska struktura galne kiseline (National Center for Biotechnology Information, 2022b)

Najvažniji predstavnici skupine hidroksicimetnih kiselina su: kafeinska kiselina (3,4-hidroksicimetna) (Slika 3), ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna) i *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna). *p*-kumarinska kiselina je najviše istražena hidroksicimetna kiselina i

dominantno je prisutna u sjemenkama i lišću brojnih biljnih vrsta (Miller i Begoña Ruiz-Larrea, 2002).

Olszewska i Wolbis (2000) su identificirali 8 fenolnih kiselina u cvijetu trnine sa područja Poljske: galnu, protokatehinsku, *p*-hidroksibenzojevu, klorogensku, vanilinsku, kafeinsku, *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu.



**Slika 3.** Kemijska struktura kafeinske kiseline (National Center for Biotechnology Information, 2022i)

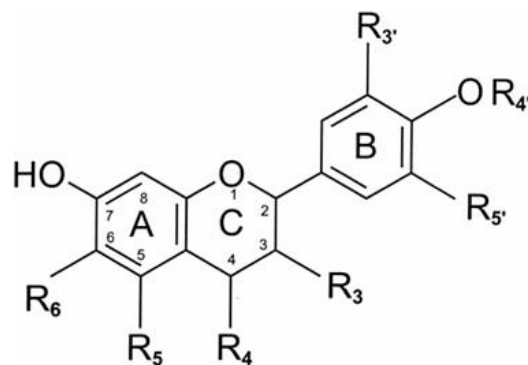
Lovrić i sur. (2017) su u ekstraktu cvijeta trnine ubranom na području Republike Hrvatske kvantificirali ukupne hidroksicimetne kiseline iz ekstrakta cvijeta trnine sa područja Hrvatske čija je srednja vrijednost iznosila 20.2 mg/g ekvivalenta kafeinske kiseline.

Marchelak i sur. (2017) su identificirali 12 fenolnih kiselina također u cvjetovima trnine sa područja Poljske tj. 3 izomera kafeoilkina kiseline (neoklorogenska, kriptoklorogenska i klorogenska kiselina), 3 izomera kumaroilkina kiseline (3-*O-p*-kumaroilkina, 4-*O-p*-kumaroilkina i 5-*O-p*-kumaroilkina kiselina), 2 izomera ferulinske kiseline (3-*O*-feruloilkina i 4-*O*-feruloilkina kiselina), jednostavnu kafeinsku kiselinu i *p*-kumarinsku kiselinu, te heksozide kafeinske i ferulinske kiseline.

Elez Garofulić i sur. (2018) su primjenom UPLC-MS<sup>2</sup> identificirali 8 fenolnih kiselina i njihovih derivata: galnu, kafeinsku i ferulinsku kiselinu, 2 izomera kafeoilkine kiseline (neoklorogenska i klorogenska kiselina), 2 izomera kumaroilkine kiseline (3-*O-p*-kumaroilkina i 4-*O-p*-kumaroilkina kiselina) i 1 izomer ferulinske kiseline (3-*O*-feruloilkina kiselina).

## 2.2.2. Flavonoidi cvijeta trnine

Flavonoidi su velika skupina fenolnih spojeva kojih je do sada identificirano više od 6000 (Laoué i sur., 2022). Imaju antioksidacijska svojstva tj. štite biljku od slobodnih radikala. Koncentrirani su u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Svi flavonoidi imaju istu osnovnu strukturu difenil propana (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), u kojoj su fenolni prstenovi (prsten A i prsten B) obično povezani u heterociklički prsten (Slika 4). Strukturna raznolikost flavonoida proizlazi iz varijacije u stupnju hidroksilacije i oksidacije središnjeg piranskog prstena koji se temelji na prisutnosti ili odsutnosti dvostruke veze između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> i stvaranju karbonilne skupine na C<sub>4</sub>. U literaturi su prisutne brojne klasifikacije flavonoida, jedna od njih je i na osnovi hidroksilacije i varijacija u C prstenu na flavonole, flavanole, flavone, antocijane i flavanone (Panche i sur., 2016).

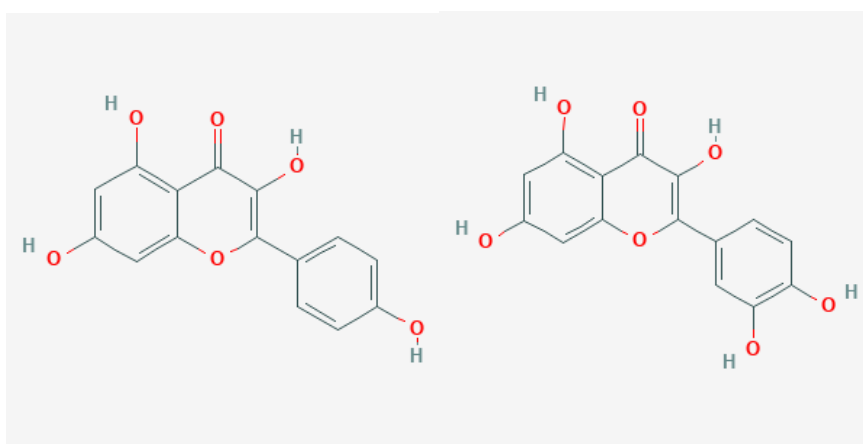


**Slika 4.** Osnovna struktura flavonoida (Hertzog i Tica, 2012)

Flavonoidi pokazuju veliku sklonost umrežavanja i polimerizacije, a u biljkama su uglavnom prisutni u obliku 3-*O*-glikozida ili polimera. Glikozidni ostatak je najčešće glukoza, ali često se pojavljuju i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza, te disaharid je rutinozid (Miller i Begoña Ruiz-Larrea, 2002). Biološka aktivnost flavonoida uključujući i njihovo antioksidacijsko djelovanje ovisi o njihovoj strukturi i glikozidaciji.

### 2.2.2.1. Flavonoli i flavonol glikozidi cvijeta trnine

Flavonole strukturno karakterizira dvostruka veza između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma, karbonilna skupina prisutna u položaju C<sub>4</sub> i prsten B pričvršćen na heterociklički prsten na položaju C<sub>2</sub>. Budući da UV zračenje stimulira njihovu sintezu akumuliraju se prvenstveno u površinskim tkivima biljaka, tj. pokožici i listovima. Njihova koncentracija je proporcionalna izloženosti biljke sunčevim zrakama. Općenito, poznato je više od 347 kamferol glikozida i 279 kvercetin glikozida (Tsao, 2010). Najzastupljeniji flavonoli cvijeta trnine su kamferol i kvercetin (Slika 5) te njihovi glikozidi koji najčešće sadrže glukozu i ramnozu.



**Slika 5.** Kemijska struktura kamferola i kvercetina (National Center for Biotechnology Information, 2022g, 2022d)

Dosadašnja istraživanja pokazuju da flavonoli i njihovi glikozidi predstavljaju dominantnu skupinu svih fenolnih spojeva u cvijetu trnine (Olszewska i Wolbiś, 2001, 2002; Olszewska i sur., 2001a; Lovrić i sur., 2017; Marchelak i sur., 2017; Elez Garofulić i sur., 2018).

Prema istraživanju (Wagner i Bladt, 1996) cvijet trnine sadrži: 3 glikozida kvercetina (rutin, hiperozid, kvercetin-3-*O*-arabinozid) i 3 kamferol glikozida (kamferol-3,7-*O*-diramnozid, kamferol-3-*O*-ramnozid i kamferol-3-*O*-arabinozid).

Olszewska i Wolbis (2001) su među prvim autorima koji su objavili identifikaciju flavonola iz cvijeta trnine sa područja Poljske. Primjenom kemijskih i spektroskopskih metoda (UV, IR, LSI MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) identificirali su 9 flavonoida: kamferol, kvercetin, kamferol-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranozid, kamferol-3-*O*- $\alpha$ -L-

ramnopiranozid, kamferol-7-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranozid, kamferol-3-*O*- $\beta$ -D-ksilopiranozid i kamferol-3-*O*-(2''-*E*-*p*-kumaroil)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid. Glikozidi kamferola, kamferol-7-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranozid, kamferol-3-*O*- $\beta$ -D-ksilopiranozid i kamferol-3-*O*-(2''-*E*-*p*-kumaroil)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid po prvi put su izolirani i identificirani u cvijetu trnine te predstavljaju klasu spojeva koja do tada nije identificirana u drugim biljkama.

Stefova i sur. (2001) su također RP-HPLC metodom potvrdili dominaciju kvercetina i kamferola u ekstraktu cvijeta trnine s područja Makedonije, te ističu veliki potencijal primjene cvijetova u fitoterapiji.

Olszewska i Wolbiś (2002b) u daljim istraživanjima identificiraju još 7 novih flavonola u cvijetu trnine primjenom različitih metoda (UV, LSI MS, 1D i 2D NMR): kvercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranozid, kvercetin-3-*O*- $\beta$ -D-ksilopiranozid i kamferol-3,7-di-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranozid; dok su prvi put identificirani kvercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranozid, kvercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, kamferol-3-*O*-(4''- $\beta$ -D-glukopiranozil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozid i kvercetin-3-*O*-(4''- $\beta$ -D-glukopiranozil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozid.

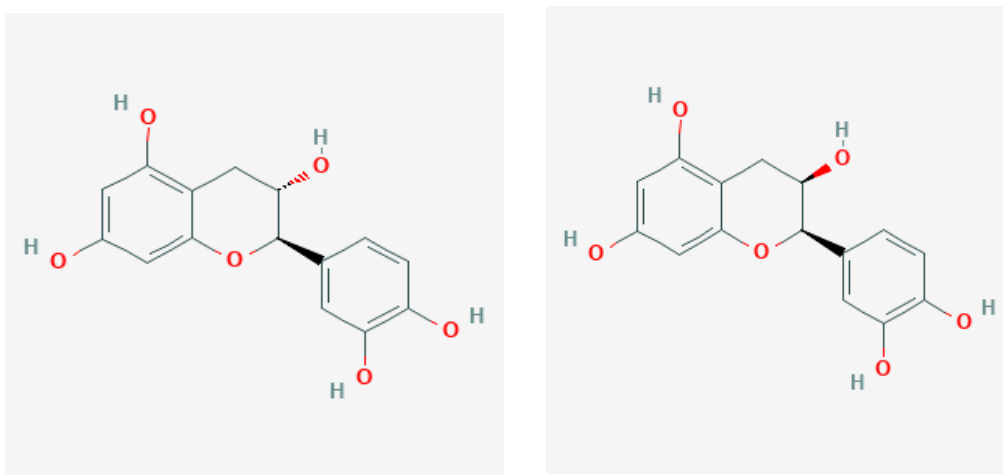
Lovrić i sur. (2017) su u ekstraktu cvijeta trnine iz Hrvatske dobivenom uz pomoć mikrovalne ekstrakcije također kao dominantnu skupinu spojeva odredili flavonole i to u koncentraciji 20.6 mg/g kvercetin ekvivalenta.

Marchelak i sur. (2017) također su potvrdili ukupne flavonole kao najzastupljeniju fenolnu skupinu (srednja vrijednost 490.63 mg/g suhe tvari) i UHPLC-PDA-ESI-MS<sup>3</sup> metodom identificirali su 33 pojedinačna spoja: 2 slobodna aglikona kvercetina i kamferola, 10 kamferol glikozida, 8 kamferol monoglikozida i diglikozida, 1 kamferol acetil heksozid ramnozid, 8 kvercetin glikozida, 1 kvercetin heksozid pentozid, 1 kvercetin acetil heksozid ramnozid, 1 kvercetin *p*-kumaroil pentozid i izoramnetin diheksozid.

Flavonoli su potvrđeni kao dominantna skupina fenolnih spojeva i u ekstraktima cvijetova trnine s područja Hrvatske u kojima su Elez Garofulić i suradnici (2018) UPLC-MS<sup>2</sup> metodom su identificirali i kvantificirali 13 flavonola: 6 kamferol glikozida (kamferol ramnozil heksozid, kamferol pentozil heksozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol pentozid, kamferol ramnozid i kamferol acetil heksozid), 6 kvercetin glikozida (kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid i kvercetin acetil heksozid) i isoramnetin rutinozid.

### 2.2.2.2. Flavanoli cvijeta trnine

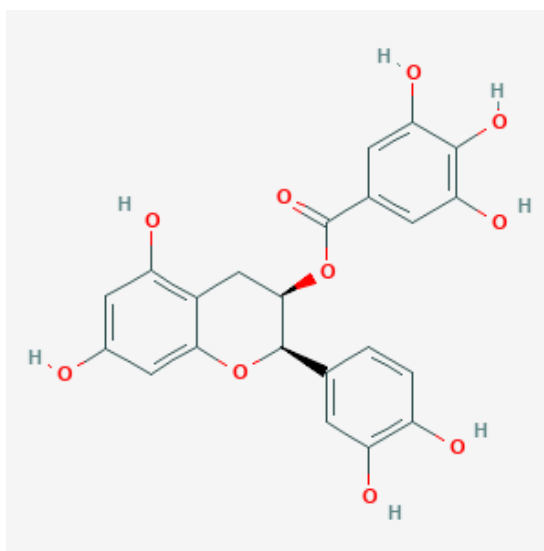
Flavanoli ili flavan-3-oli ili katehini strukturalno se razlikuju od većine flavonoida jer ne sadrže dvostruku vezu između  $C_2$  i  $C_3$  atoma i nemaju karbonilnu skupinu na  $C_4$  atomu u prstenu C. Ova atipična struktura i hidroksilacija na  $C_3$  atomu omogućuje flavanolima da imaju dva kiralna centra na molekuli (na  $C_2$  i  $C_3$  atomima) tj. četiri moguća diastereoizomera. Katehin je izomer sa *trans* konfiguracijom, a epikatehin je izomer sa *cis* konfiguracijom. Svaka od ove dvije konfiguracije ima dva stereoizomera, tj. (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin. (+)-katehin i (-)-epikatehin su dva izomera koja se često nalaze u biljkama (Slika 6). Katehin, epikatehin i njihovi derivati glavni su fenolni spojevi u lišću čaja tj. biljke *Camelia sinensis* (Gadkari i Balaraman, 2015; Granza i sur., 2005).



**Slika 6.** Kemijska struktura (+)-katehina i (-)-epikatehina (National Center for Biotechnology Information, 2022k, 2022j)

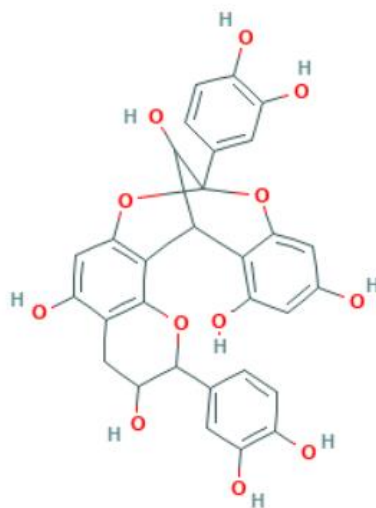
Flavanoli mogu stvarati konjugate sa galnom kiselinom kao što su epikatehin galat (Slika 7), epigalokatehin i epigalokatehin galat (Braicu i sur., 2013).





**Slika 7.** Kemijska struktura epikatechingalata (National Center for Biotechnology Information, 2022a)

Ovisno o interflavanskim vezama proantocijanidini mogu imati biti strukturu tipa A (Slika 8) u kojoj su monomeri povezani C<sub>2</sub>-O-C<sub>7</sub> ili C<sub>2</sub>-O-C<sub>5</sub> vezom, ili tipa B kojoj su monomeri povezani C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ili C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, dok je procijanidin C1 trimer.



**Slika 8.** Kemijska struktura A-procijanidina (National Center for Biotechnology Information, 2022c)

Kolodziej i sur. (1991) prvi su identificirali prisustvo A-procijanidina u cvijetu trnine i to njegova 4 dimera: ent-epikatehin-(4 $\alpha$ →8;2 $\alpha$ →O→7)-katehin, ent-epikatehin-

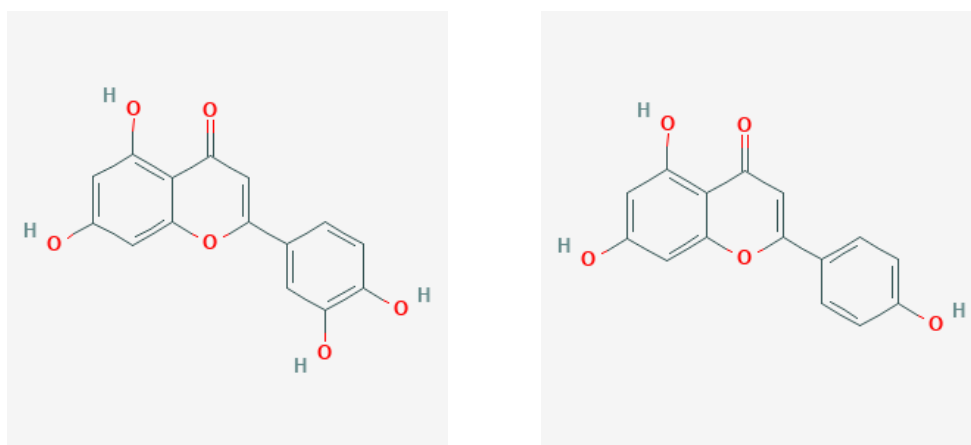
(4 $\alpha$ →8;2 $\alpha$ →O→7)-epikatehin, ent-epiafzelehin-(4 $\alpha$ →8;2 $\alpha$ →O→7)-epikatehin i ent-epiafzelehin-(4 $\alpha$ →8;2 $\alpha$ →O→7)-katehin.

Marchelak i sur. (2017) identificirali su 7 flavanola: (+)-katehin, (-)-epikatehin, 3 dimerna A-procijanidina (koja se sastoje od 2 epikatehina) i 2 dimerna A-procijanidina (koja se sastoje od epiafzelehina i epikatehina). Također su potvrdili prisustvo prethodno izoliranih A-procijanidina iz cvijeta trnine iz 1991. godine.

Elez Garofulić i sur. (2018) su identificirali u ekstraktu cvijeta trnine 5 flavanola: katehin, epikatehin, epikatehin galat, epigalokatehin i procijanidin B1. Ovo istraživanje je potvrdilo katehin kao najzastupljeniji spoj iz skupine flavanola i u ekstraktu cvijeta trnine iz Hrvatske.

### 2.2.2.3. Flavoni cvijeta trnine

Strukturna specifičnost flavona je prisutnost karbonilne skupine na C<sub>4</sub> atomu, prsten B je pričvršćen na heterociklički prsten na položaj C<sub>2</sub> i prisutna je dvostruka veza između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma. Najvažniji flavoni su luteolin i apigenin (Slika 9) koji su uglavnom prisutni u formi glikozida (Durazzo i sur., 2019).



**Slika 9.** Kemijska struktura luteolina i apigenina (National Center for Biotechnology Information, 2022f, 2022e)

2018. godine Elez Garofulić i sur. su identificirali 2 flavona iz ekstrakta cvijeta trnine i to luteolin i apigenin-pentozid (Elez Garofulić i sur., 2018).

### **2.2.3. Tradicionalna upotreba cvijeta trnine i zdravstveni benefiti fenolnih spojeva cvijeta trnine na zdravlje čovjeka**

Uporaba samoniklog ljekovitog bilja najstariji je način prevencije, ublažavanja i liječenja pojedinih bolesti, a podrazumijeva uporabu cjelovitih ljekovitih biljaka ili njenih pojedinih dijelova, različitih biljnih ekstrakata i gotovih biljnih proizvoda. Zabilježeno je da se plodovi i cvijeće trnine, tradicionalno se koriste u fitoterapiji (Domokos i sur., 2018). Trnina je jedna od biljnih vrsta koje se više od 7000 godina koristi na području Europe, prvenstveno zbog jestivih plodova (Łuczaj i Szymański, 2007; Şükran, 2008) te kasnije i zbog ljekovitih svojstava ostalih dijelova biljke (Ciuperca i sur., 2019; Kumarasamy i sur., 2003; Veličković i sur., 2021).

U različitim dijelovima Europe, cvijeće i latice trnine se najčešće koriste u mješavinama za pripremu ljekovitih čajeva, sirupa, svježeg soka ili tinkture koji se primjenjuju u liječenju proljeva, anemije i drugih bolesti (Popescu, 2016). Također, zabilježeno je da se cvjetovi i listovi trnine koriste se kao homeopatski pripravci i u Njemačkoj (Schwabes, 1924) i u Europskom dijelu Turske. Vodena infuzija cvjetova se koristi kao učinkovit laksativ i diuretik (Karakas i sur., 2019; Özcan i Bayçu, 2008), te za smirenje i poticanje znojenja (Özcan i Bayçu, 2008). Dok se prema etnofarmakološkim izvorima zapadne Turske (provincija Çanakkal) osim već navedenog diuretskog djelovanja, cvijeće trnine koristi i zbog svoje vazoprotektivne, protuuplanske i spazmolitičke aktivnosti (Sönmez i sur., 2021). Nadalje, cvjetovi trnine se koriste u mješavini čaja za regulaciju menstrualnog ciklusa (Šarić-Kundalić i sur., 2010).

Osim na području Europe, tradicionalna uporaba cvjetova trnine prisutna je i u narodnoj kineskoj (Liu i sur., 2020) i indijskoj medicini (Poonam i sur., 2012).

Ljekovita svojstva pripravaka od različitih dijelova trnine pripisuju se fenolnim spojevima kao jednoj od najzastupljenijih skupina bioaktivnih molekula ove biljke.

Fenolni spojevi, nekad poznati pod nazivom biljni tanini, su najistraživanije biološki aktivne molekule u području botanike, poljoprivrede, kemije i ljudske prehrane. U periodu od

2006. do 2016. godine objavljeno je 33 140 znanstvenih radova (sa dvostrukim povećanjem 2012. godine i trostrukim povećanje broja radova 2016. godine u odnosu na 2006. godinu) od ukupno 36 782 (u periodu od 1900.-2016.) (Adebooye i sur., 2018). Kvercetin (21 605) i kamferol (7 950) su najistraživaniji fenolni spojevi (Rasouli i sur., 2017). Prema podacima baze podataka Google scholar od 2016. do danas objavljeno je oko 127 000 znanstvenih radova.

Kompleksan fenolni profil cvijeta trnine pokazuje brojne pozitivne utjecaje na zdravlje čovjeka. Ekstrakti cvijeta trnine djeluju: na mokraćni sustav potičući izlučivanje mokraće i smanjujući upalne procese, na probavni sustav olakšavajući probavu tj. imaju laksativni učinak, na krvožilni sustav smanjujući propusnost krvnih žila, te potpomažu uklanjanje suvišnih natrijevih iona iz ljudskog organizma (Sikora i sur., 2013).

Brojna istraživanja dokazala su antioksidacijska, antimikrobna, antivirusna, antialergijska, antikancerogena, antimutagena, protuupalna i kardioprotektivna svojstva fenolnih spojeva.

Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati pokazuju snažno antioksidacijsko djelovanje, te imaju veći antioksidacijski kapacitet od derivata hidroksibenzojevih kiselina (Gulcin, 2020).

Galna kiselina posjeduje antioksidacijska (Marino i sur., 2014), antikancerogena (Ho i sur., 2013; Lin i sur., 2021), antibakterijska i anifugalna (Lima i sur., 2016) i antiviralna (Choi i sur., 2010) svojstva, te antidijabetička, analgetska, protuupalna, hepatoprotektivna i antidepresiva svojstva (Gupta i sur., 2021; Kadota i sur., 2018; Shabani i sur., 2020). Od hidroksicimentnih kiselina, *p*-kumarinska kiselina pokazuje snažno antikancerogeno djelovanje dokazano brojnim istraživanjima (Boo, 2019; De Souza Rosa i sur., 2018; Kong i sur., 2013). Također klorogenska (Hou i sur., 2017) i kafeinska kiselina (Sari i sur., 2020) smanjuju proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva.

Dokazana su antioksidacijska i antikancerogena svojstva katehina, epikatehina i njihovih konjugata sa galnom kiselinom (Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018), kao i zaštitni utjecaj u razvoju kardiovaskularnih bolesti (Chen i sur., 2016; Eng i sur., 2018). Nadalje, pokazalo se da su za snažni antioksidacijski i antitumorski učinak zaslužne dvije glavne komponente ekstrakta cvijeta trnine, kvercetin (Anand David i sur., 2016; Costa i sur., 2016; Salehi i sur., 2020) i kamferol (Devi i sur., 2015; Imran i sur., 2019; Kashyap i sur., 2017).

Brojna istraživanja dokazala su snažno antikancerogeno djelovanje apigenina (Fang i sur., 2007; Shukla i Gupta, 2010; Tong i Pelling, 2013) i luteolina (Huang i sur., 2019; Iida i sur., 2020).

Dosadašnja istraživanja antioksidacijskog kapaciteta cvijeta trnine prevedena su DPPH i FRAP metodama (Lovrić i sur., 2017; Marchelak i sur., 2017). Lovrić i suradnici (2017) ispitivali su AOK etanolnih i metanolnih ekstrakata (50 vol.% i 70 vol.%) cvijeta trnine dobivenih nakon mikrovalno potpomognute ekstrakcije (u trajanju od 5, 15 i 25 minuta pri mikrovalnim jačinama od 100, 200 i 300 W) pri različitim temperaturama (40, 50 i 60°C). Najveći AOK izmjeren je (i DPPH i FRAP) u 50% metanolnom ekstraktu cvijeta trnine. Marchelak i suradnici (2017) ispitivali su AOK različitih ekstrakata cvijeta trnine (MED – metanolni ekstrakt, DEF – dietil eter ekstrakt, EAF – etil acetat ekstrakt, BF – n-butanol, WR – vodeni ostatak ekstrakta) s područja Poljske DPPH i FRAP metodama. Neovisno o vrsti antioksidacijske metode koja je korištena, najveći AOK pokazivali su ekstrakti sa EAF pa DEF > BF > MED > WR, što je i odgovaralo sadržaju ukupnih fenola i flavonoida u tim ekstraktima te su dokazali da na AOK ekstrakata značajan utjecaj ima odabir otapala.

Zbog svih navedenih djelovanja fenolnih spojeva cvjetova trnine ovi tradicionalni biljni lijekovi se preporučuju u prevenciji bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Marchelak i sur., 2019). Prema najnovijim istraživanjima vezanim za utjecaj prirodnih lijekova na bolest COVID-19 (Wyganowska-Swiatkowska i sur., 2020) dokazano je flavonoidi kvercetin i luteolin inhibiraju SAR-CoV 3CLpro proteazu (Jo i sur., 2020).

#### **2.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva**

Fenolni spojevi su raspoređeni u biljnim tkivima i stanicama, a njihova koncentracija i svojstva ovise o biljnoj vrsti, korištenom dijelu, stupnju zrelosti, metodama ekstrakcije i sl. Ekstrakcija je postupak kojim se izdvajaju fenolni spojevi iz kompleksnog biljnog matriksa, a učinkovitost postupka ovisi o brojnim faktorima. Ne postoji jedinstvena standardna metoda ekstrakcije već je za svaki biljni materijal bitno odabrati najbolju metodu, vrstu otapala i operativne parametre ekstrakcije koji utječu na njenu efikasnost. Stoga, količina ekstrahiranih fenolnih spojeva ovisi o vrsti, polarnosti i koncentraciji otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije i o fizikalnim karakteristikama biljnog materijala (Adebooye i sur., 2018).

U konvencionalne metode ekstrakcije spadaju Soxhlet ekstrakcija i maceracija koje karakterizira duže vrijeme trajanja i veći utrošak otapala. Alternativne i ekološki prihvatljivije metode su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction* - UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction* - MAE), superkrična fluidna ekstrakcija (engl. *Supercritical Fluid Extraction* - SFE) i ekstrakcija vodom u supkričnom stanju (engl. *Subcritical Water Extraction* - SWE). Generalna prednost alternativnih metoda je kraće vrijeme ekstrakcije, manji utrošak otapala i energije (Ameer i sur., 2017) i veća efikasnost u odnosu na konvencionalne metode.

Budući da su fenolni spojevi termolabilne biološki aktivne molekule za njihovu ekstrakciju iz biljnog materijala vrlo često se koristi UAE koju karakterizira primjena niže temperature u odnosu na temperature koje se koriste kod konvencionalnih metoda (Osorio-Tobón, 2020). Primjenom ultrazvuka tj. zvučnih valova frekvencije između 20 kHz i 100 MHz, događa se fenomen kavitacije. Fenomen kavitacije podrazumijeva stvaranje, rast i puknuće mjehurića što dovodi do ubrzavanja otpuštanja organskih spojeva sadržanih unutar stanica tkiva koje se tretira i ubrzanja prijenosa mase. Ovim fenomenom omogućena je lakša ekstrakcija staničnog materijala pomoću otapala koje se koristi. Stoga su prednosti ultrazvučno potpomognute ekstrakcije veća efikasnost, poboljšanje kvalitete ekstrakta, veća brzina same metode i mogućnost uporabe raznih vrsta otapala (Ayaz Seyhan i sur., 2020; Both i sur., 2014; Horžić i sur., 2012; Jovanovic i sur., 2017). Također su uređaji koji se koriste za UAE jeftiniji i jednostavniji za korištenje u odnosu na druge alternativne metode ekstrakcije.

Dosadašnja istraživanja ekstrakcije fenolnih spojeva iz različitih biljnih vrsta primjenom UAE obuhvaćaju ekstrakciju iz listova timijana (Jovanović i sur., 2017), zelenog čaja (Menezes Maciel Bindes i sur., 2019), lista masline (Dobrinčić i sur., 2020), lista lovora (López-Fernández i sur., 2020), te iz cvijeća ognjenog drva (*Delonix regia*) (Adjé i sur., 2010), cvijeta trnine (Lovrić i sur., 2017), bagrema (*Robinia pseudoacaciae*) (Gajic i sur., 2019) i cvjetova bazge (Kaltsa i sur., 2020).

Lovrić i sur. (2017) istraživali su utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (snage mikrovalova 100, 200 i 300 W) na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida, ukupnih hidroskicimernih kiselina i ukupnih flavonola u cvijetu trnine sa područja Hrvatske. Istraživani parametri ekstrakcije su bili: vrsta i koncentracija otapala (50% i 70% vodena otopina etanola i metanola), vrijeme ekstrakcije (5, 15 i 25 minuta) i temperatura ekstrakcije (40, 50 i 60 °C). Dobiveni rezultati su pokazali da je količina fenolnih spojeva bila veća u 70% otopinama etanola i metanola, a vodena otopina etanola bila je bolje otapalo za

ekstrakciju fenolnih spojeva cvijeta trnine od vodene otopine metanola. Temperatura između 50 i 60 °C i duže vrijeme ekstrakcije (od 15-25 minuta) imali su pozitivan učinak na prinos fenolnih spojeva.

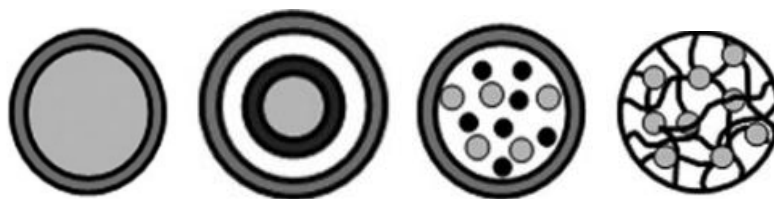
Nedostaci biljnih ekstrakta su: slaba topivost u vodi zbog čega se koriste organska otapala (npr. metanol, etanol, heksan, diklorometan, etil acetat, itd.) što otežava izravnu upotrebu ekstrakata za ljude, fizikalno-kemijska nestabilnost, ograničenje uporabe zbog kompleksnog sastava, manja biološka aktivnost *in vitro* u usporedbi s čistim kemijskim spojevima te gubitak sinergističkog djelovanje bioaktivnih spojeva prilikom izdvajanja pojedinih bioaktivnih spojeva. Da bi se uklonili navedeni nedostaci nedavna su istraživanja usmjerena na razvoj novih načina formuliranja biljnih ekstrakata od koji je inkapsulacija metodom sušenja raspršivanjem jedna od najčešćih.

### 2.3. Inkapsulacija fenolnih spojeva

Stabilnost fenolnih spojeva uvjetovana je brojnim čimbenicima (izloženosti kisiku, svjetlosti, vlažnosti, promjeni temperature i pH vrijednosti) koji utječu na smanjenje ili potpuni gubitak njihove biološke aktivnosti (Bartosz i Irene, 2019). Najčešće korištene metode stabilizacije fenolnih spojeva su metode inkapsulacije kojima se povećava se njihovu stabilnost, a time i mogućnost njihove primjene, te se postiže očuvanje njihove biološke aktivnosti.

Inkapsulacija je proces u kojem se biološki aktivna tvar potpuno omota, prekrije i zaštićuje fizičkom barijerom tj. nosačem. Bioaktivna tvar koju se inkapsulira se zove glavna, aktivna, interna ili korisna faza, a tvar koja je inkapsulira se zove membrana, školjka, kapsula, nosač, eksterna faza ili matriks (Fang i Bhandari, 2010). Tipičan oblik inkapsulata je sferni, ali je moguće dobiti i druge oblike npr. cilindrične ili nepravilne (Zuidam i Shimoni, 2010). Veličina kapsule se može klasificirati u tri kategorije: mikrokapsule u rasponu između 0,2 i 5000  $\mu\text{m}$ , mikrokapsule veće od 5000  $\mu\text{m}$  i nanokapsule koje su manje je od 0,2  $\mu\text{m}$  tj. 200 nm (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

Morfologija mikrokapsula ovisi uglavnom od inkapsuliranoj aktivnoj tvari i procesu nastajanja omotača oko nje (Mali Snehal i sur., 2013). Stoga se razlikuju četiri osnovne strukture mikrokapsula (Slika 10): mononuklearne mikrokapsule koje imaju jedan omotač oko aktivne tvari, mononuklearne mikrokapsule koje imaju više omotača oko aktivne tvari, polinuklearne mikrokapsule koje imaju više jezgri zatvorene unutar omotača i matriks u kojem je aktivna tvar homogena unutar nosača (Augustin i Hemar, 2009).



**Slika 10.** Morfologija mikrokapsula (Augustin and Hemar, 2009)

Najčešće korištene metode inkapsulacije fenolnih spojeva su: ionsko geliranje, molekularna inkluzija, koacervacija, emulzifikacija, ekstruzija, liofilizacija i sušenje raspršivanjem (Grgić i sur., 2020).



**Ionsko geliranje** uključuje istiskivanje otopine polimera kroz iglu za ubrizgavanje u kojoj su otopljeni ili dispergirani BAS. Kapljice se prenose do sredstva za raspršivanje faza tj. gelirajućeg medija, te nakon reakcije prelaze u sferične čestice gela (Vandamme i sur., 2007). Tehnika ionskog geliranja je jednostavna i blaga jer ne koristi visoke temperature, tlakove ili organska otapala. Čimbenici koji utječu na njenu učinkovitost su: koncentracija polimera i kationa za geliranje, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija biološki aktivnog sastojka (Racovića i sur., 2009).

**Molekularna inkluzija** je metoda inkapsulacije koja se odvija se na molekularnoj razini. Princip metode zasniva se na stvaranju inkluzijskih kompleksa s nepolarnim molekulama uslijed vodikovih veza, elektrostatickih interakcija i van der Waalsvih veza. Ciklodekstirni su najčešće korišteni nosači za inkapsulaciju molekularnom inkluzijom zbog svoje specifične građe tj. vanjskog hidrofilnog i unutarnjeg hidrofobnog dijela.

Princip **koacervacije** je odvajanje hidrokoloida iz početne otopine i stvaranje koacervata oko inkapsulirane aktivne tvari. Vrsta koacervacije određena je brojem korištenih polimernih nosača. Jednostavna koacervacija je ona koja koristi jedan polimerni nosač, dok se kod složenih koacervacija koriste polimerne smjese. Za povećanje čvrstoće i stabilnosti nosača mogu se koristiti i sredstva za umrežavanje. Elektrostaticke interakcije sredstava za umrežavanje pomažu samo stvaranje koacervata. Koacervacija ima visoku učinkovitost inkapsulacije i kontrolirano otpuštanje inkapsulirane aktivne tvari, ali je inkapsulirani materijal nestabilan u vodenim otopinama i ima tendencija aglomeriranja. Sam proces je skup i osjetljiv promjenu pH vrijednosti (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

**Emulzifikacija** se temelji na pripremi dvofaznog sustava koji se sastoji od vodene i uljne faze uz dodatak emulgatora za stabilizaciju emulzije. Nakon emulgiranja inkapsulirani BAS mogu biti u tekućem obliku ili u obliku praha ako se nakon emulgiranja suše. Prikladna je i za lipofine i hidrofilne spojeve. Hidrofilni fenolni spojevi inkapsuliraju se u emulzijama tipa voda u ulju, dok se lipofilni inkapsuliraju u emulzijama tipa ulje u vodi (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

**Ekstruzija** je inkapsulacijska metoda u kojoj se propušta polimerna otopina koja sadrži aktivnu komponentu kroz mlaznicu u otopinu za geliranje. Natrijev alginat je najčešće korišten nosač, a alginatni gel se tvori u prisutnosti kalcija tj. kapanjem otopine natrijeva alginata u otopinu kalcijevog klorida. Prednosti ekstrudiranja su: sposobnost inkapsulacije hidrofobnih i hidrofilnih BAS, laka izvedba u laboratorijskim razmjerima i dugotrajnost dobivenih kapsula.

Dok su nedostaci metode to što nastaju velike porozne kapule koje uzorkuju brzo otpuštanje inkapsuliranih BAS te je ograničen raspon nosača koji se mogu koristiti.

Specifičnost *liofilizacije* kao inkapsulacijske metode je smrzavanje vode u uzorku te njeno uklanjanje primarno sublimacijom i sekundarno desorpcijom. Sublimacijom se smrznuta voda prevodi direktno u plinovito stanje, dok krute osušene tvari zaostaju. Konačan produkt je suhi prah velike površine koji se lako rehidrira (Fang i Bhandari, 2010). Budući da se liofilizacija provodi pri niskoj temperaturi i tlaku pogodna je kao inkapsulacijska metoda termolabilnih spojeva. U usporedbi sa inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem glavni nedostaci liofilizacije su visoki troškovi i dugo vrijeme dehidracije.

Uz prethodno navedene metode, *sušenje raspršivanjem* je jedna od najstarijih i još uvijek jedna od najefikasnijih metoda inkapsulacije koja će biti detaljnije opisana u nastavku.

## **2.4. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem**

Učinkovitost biljnih ekstrakata ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, profilu i koncentraciji bioaktivnih spojeva te o njihovoj bioraspoloživosti. Biljni ekstrakt je složena mješavina spojeva koji mogu imati antioksidativna (Zhao, 2008), antimikrobna (Oulahal i Degraeve, 2022) antivirusna (Drisya i Firoskhan, 2021), antikancerogena (Bae i sur., 2017), antiparazitska (Strothmann i sur., 2022), antigljivična (Sepahvand i sur., 2017), hipoglikemijska (Governata i sur., 2018), antihipertenzivna (Ajabli i Eddouks, 2020) i insekticidna svojstva (Sivakumar i Sivakumar, 2022) te stoga imaju velik potencijal primjene u različitim segmentima prehrambene i farmaceutske industrije. Inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem se biljni ekstrakti prevode u stabilniju formu praha uz upotrebu nosača pri čemu im se povećava topljivost bioaktivnih spojeva, bioraspoloživost, stabilizira koncentracija u plazmi i poboljšava njihova stabilnost (Armendáriz-Barragán i sur., 2016).

Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem tehnika je koja se primarno se koristila za inkapsulaciju termolabilnih BAS zbog kratkog vremena sušenja (Gunjal, 2020). Zbog specifične tehnologije raspršivanja omogućena je primjena relativno visokih temperatura sušenja, dok temperatura samog proizvoda ostaje niska. Konačni proizvod je dobre kvalitete s

niskim sadržajem vode i smanjenom težinom što omogućava lakše skladištenje i transport. Fizikalno-kemijska svojstva konačnog proizvoda uglavnom ovise o protoku, veličini čestica, viskoznosti, ulaznoj i izlaznoj temperaturi sušenja, tlaku i vrsti raspršivača (Murugesan i Orsat, 2012). Konačni proizvod može biti u obliku granula, praha ili aglomerata što ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima tekuće sirovine i procesnim parametrima. Promjer mikrokapsula dobivenih metodom sušenja raspršivanjem može varirati u rasponu od 10 i 400  $\mu\text{m}$  (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

Prije samog procesa sušenja u tekući biljni ekstrakt dodaju se nosači. Funkcija nosača osim zaštite i stabilizacije fenolnih spojeva je poboljšanje samog procesa sušenja tj. smanjenje ljepljivosti i stvaranja aglomerata, te nastanak finalnog proizvoda što boljih svojstava (Lee i sur., 2018).

Proces sušenja raspršivanjem sastoji se od četiri glavne faze koje uključuju raspršivanje u struji vrućeg plina (najčešće atmosferskog zraka), kontakt između plina sušenja i medija koji se raspršuje, sušenje i odvajanje proizvoda od medija za sušenje. Ove četiri faze i njihovi parametri imaju velik utjecaj na učinkovitost sušenja i svojstva konačnog proizvoda (Cal i Sollohub, 2010).

Postupak raspršivanja općenito se odnosi na stvaranje tekuće suspenzije u zraku, što direktno utječe na smanjenje veličine kapljica. Efikasnim raspršivanjem tekuća suspenzija se pretvara u kapljice iste veličine što dovodi do ujednačenja prijenosa topline i mase tijekom postupka sušenja. Zbog razlike u temperaturi prijenos topline se odvija od zraka prema materijalu koji se suši. Suprotno tome se odvija prijenos mase odnosno vlage, od materijala koji se suši prema zraku, zbog razlike u tlaku pare. Smanjenjem veličine kapljica i njihovim raspršivanjem u suhom zraku eksponencijalno se povećava njihova aktivna površina zbog čega sušenje traje samo par sekundi. Tako se smanjenjem promjera kapljice od 1 mm na 10  $\mu\text{m}$  povećava ukupna površina za 100 puta (Mujumdar, 2001). Odabir raspršivača bazira se na svojstvima ulazne sirovine koja se suši (npr. njene viskoznosti) i željenim karakteristikama finalnog proizvoda kao i veličini čestica finalnog proizvoda.

Najčešće se koriste rotirajući raspršivači, tlačne i pneumatske mlaznice (Cal i Sollohub, 2010). Rotirajući raspršivači su prikladniji za sušenje viskoznijih namirnica zbog manje mogućnosti začepljenja u odnosu na mlaznice. Prednost tlačnih (hidrauličkih) mlaznica u odnosu na rotirajuće raspršivače je u tome što se kod mlaznica formiraju kapljice ujednačenijih veličina (Poozesh i Bilgili, 2019). Pneumatske mlaznice pak imaju mogućnost

regulacije veličina kapljica mijenjanjem omjera zraka i fluida (Brennan, 2006) i mogućnost stvaranja homogene disperzije (Cal i Sollohub, 2010).

Najčešće korišteni plin je atmosferski zrak, ali se može koristiti dušik ili neki drugi inertni plin za sirovine koje se osjetljive na prisutnost kisika (Cal i Sollohub, 2010). Tijekom postupka sušenja raspršivanjem, atmosferski zrak filtrira se kroz sustav filtriranja i prethodno zagrijava prema radnim parametrima.

Kontakt između raspršenog fluida i suhog zraka određuje brzinu i intenzitet sušenja. Vrijeme zadržavanja svake kapljice unutar komore za sušenje određeno je protokom raspršivanja i veličinom komore za sušenje. Veličina komore za sušenje određuje vrijeme kontakta sa suhim zrakom. Stoga je važno da komora za sušenje i dozator zraka omogućuju lagan protok proizvoda kako bi se spriječilo djelomično taloženje osušenog proizvoda i na stijenkama komore i na raspršivaču.

Kontakt raspršenog fluida i suhog zraka vrši se u komorama za sušenje konusnog oblika. Ovisno o načinu ostvarivanja kontakta između materijala koji se suši i zraka razlikuju se istosmjerne, protusmjerne i kombinirane komore za sušenje. Najčešće se koriste istosmjerne komore za sušenje. U njima se raspršuje tekućina u smjeru toka vrućeg zraka zbog čega je dobiveni suhi proizvod izložen nižim temperaturama što smanjuje toplinsku degradaciju proizvoda. Protustrujne komore za sušenje se rijetko koriste, budući da je suhi proizvod u njima izložen višim temperaturama jer se tekućina raspršuje u smjeru suprotnom od toka vrućeg zraka. Prednost ovih komora je veća ekonomičnost tj. manji utrošak energije, ali se ne preporučuju za sušenje tvari jako osjetljivih na toplinu (Gharsallaoui i sur., 2007; Murugesan i Orsat, 2012). Kombinirani postupak je najekonomičniji i koristi se za sušenje termostabilnih materijala.

Sam proces sušenja se odvija u dvije faze. U prvoj fazi uklanja se slobodna voda iz materijala koji se suši pri konstantnoj brzini sušenja. Druga faza sušenja započinje kada količina vlage u kapljici dosegne kritičnu razinu i na njenoj površini se formira čvrsta kora. U ovoj fazi sušenja uklanja se vezana voda. Kada se izjednače temperatura čestica praha i temperatura zraka za sušenje, sušenje je završeno (Santos i sur., 2017).

Izdvajanje praškastog proizvoda iz struje zraka je završna faza sušenja raspršivanjem. Nakon sušenja veće čestice praha padaju na dno komore za sušenje, dok se sitnije čestice izdvajaju u ciklonima.

Finalni praškasti proizvodi dobiveni metodom sušenja raspršivanjem mogu se klasificirati u ljepljive i neljepljive. Neljepljivi praškovi se lako dobivaju sušenjem raspršivanjem u širokom rasponu radnih uvjeta. U ljepljive prahove spadaju oni koji su dobiveni iz različitih vrsta prirodnih sokova od voća i povrća koji sadrže visoke koncentracije šećera i kiselina te zahtijevaju specifične uvjete sušenja da bi se smanjila količina praha koji se lijepi na stijenke komore za sušenje (Muzaffar i sur., 2015).

Prednosti sušenja raspršivanjem su slijedeće: jeftina metoda, omogućava korištenje različitih vrsta nosača, dobra inkapsulacijska efikasnost, dobra stabilnost završnog proizvoda i mogućnost primjene u industrijske svrhe (Suganya i Anuradha, 2017). Nedostaci inkapsulacije sušenjem raspršivanjem su: mogućnost termodegradacije BAS koje su termolabilne, otežana kontrola veličine mikrokapsula i umjereni prinosi za male serije proizvodnje (Suganya i Anuradha, 2017).

Sušenjem raspršivanjem ekstrakti fenolnih spojeva (otopina, suspenzija, disperzija ili emulzija) različitih biljnih vrsta prevode se u stabilniju formu praha. Inkapsulacija fenolnih spojeva iz ekstrakta lista sušenjem raspršivanjem povedena je na različitim biljkama npr. *Camellia sinensis* (Wang i sur., 2016), *Satureja montana* (Vidović i sur., 2014), lista guave (Tuan i sur., 2016), lista masline (Urzúa i sur., 2017), lovora (Medina-Torres i sur., 2016), lista bijele murve *Morus alba* (Tchabo i sur., 2019). Dok je malo istraživanja provedeno ovom metodom inkapsulacije iz ekstrakta cvijeta biljaka (Rajabi i sur., 2015; Suyalek i sur., 2020).

Sušenje raspršivanjem kao inkapsulacijska metoda ima dva limitirajuća čimbenika. Prvi je termostabilnost biološki aktivnih tvari koja se inkapsulira pri temperaturi sušenja koja se obično koristi, najčešće u rasponu od 150 do 210 °C (Samantha i sur., 2015). Drugi limitirajući faktor se odnosi na karakteristike nosača koji treba imati svojstvo stvaranja zaštitnog omotača aktivne tvari i biti topiv u vodi (Adamiec, 2009). Zbog toga su odabir vrste nosača i temperature sušenja dva bitna parametra za efikasnu inkapsulaciju metodom sušenja raspršivanjem.

#### **2.4.1. Nosači za inkapsulaciju fenolnih spojeva metodom sušenja raspršivanjem**

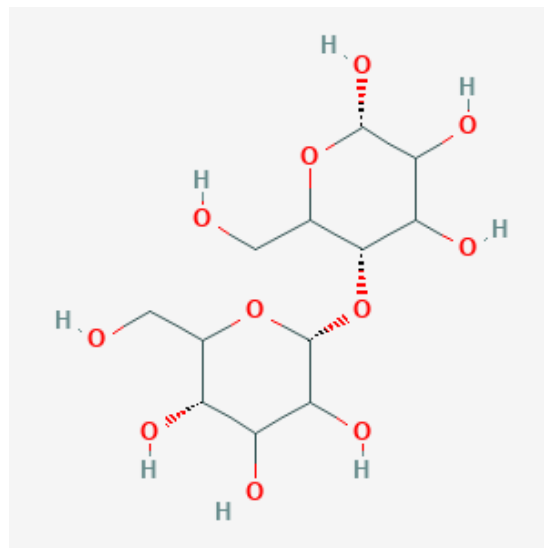
Efikasnost inkapsulacije ovisi o odabranoj metodi i odabranom nosaču/nosačima te o njihovoj interakciji (Jyothi i sur., 2010). Nosači koji se koriste za dobivanje prehrambenih

proizvoda obavezno moraju imati GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe* = općenito prepoznati kao neškodljivi) te se stoga koriste jestivi i biorazgradivi prirodni polimeri, najčešće različite vrste polisaharida.

Dobar nosač mora maksimalno zaštititi inkapsuliranu biološki aktivnu tvar od okolišnih uvjeta, zadržati je unutar kapsule tijekom procesiranja i/ili skladištenja pod različitim uvjetima, kontrolirano ispuštati aktivnu tvar u kontroliranim uvjetima, biti kemijski kompatibilan i inertan u odnosu na inkapsuliranu tvar, imati dobre reološke karakteristike i kod visokih koncentracija i laku uporabnost tijekom inkapsulacije.

Također jedna od glavnih funkcija nosača je povećanje temperature staklastog prijelaza, smanjujući ljepljivost i taloženje praha na stijenkama ciklone i tendenciju aglomeriranja praha tijekom sušenja raspršivanjem i njegovog skladištenja, što je naročito važno kod proizvoda koji sadrže visok udio šećera (Oliveira i sur., 2010).

Najčešće korišteni su polisaharidni nosači su škrob i njegovi derivati kao što su amiloza, amilopektin, dekstrini, maltodekstrini, polidekstrini, celuloza. Polisaharidni nosači koji se najčešće koriste za inkapsulaciju fenolnih spojeva sušenjem raspršivanjem su maltodekstrini različitog dekstroznog ekvivalenta.



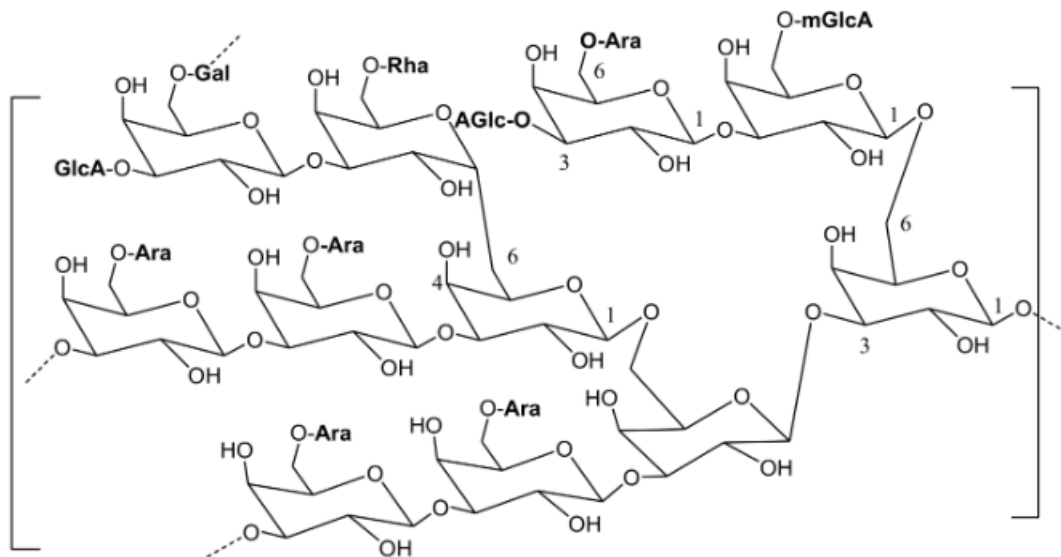
**Slika 11.** Maltodekstrin DE 10-15 - strukturna formula (National Center for Biotechnology Information, 2022h)

**Maltodekstrini** se dobivaju parcijalnom kiselim ili enzimskom hidrolizom škroba te se smatraju polimerima D-glukoze povezanim  $\alpha$ -(1,4) i  $\alpha$ -(1,6) vezama (Slika 11) (Xiao i sur., 2022; Du i sur., 2021; Garnero i sur., 2013).

Dekstrozni ekvivalent (DE) označava stupanj hidrolize molekule škroba i kreće se u rasponu od 3-20. Povećanje DE je proporcionalno sa topivosti i stupnjem slatkoće, a obrnuto proporcionalno sa otpornošću na toplinu.

Relativno su jeftini nosači, neutralne arome i okusa, niskog viskoziteta kod visoke koncentracije suhe tvari i dobro štite fenolne spojeve od oksidacije (Santiago-Adame i sur., 2015; Vidović i sur., 2014). Glavni nedostatak maltodekstrina kao nosača je nizak emulzijski kapacitet, niska temperatura tranzicije (Lee i sur., 2018) i ograničeno zadržavanje hlapljivih spojeva. Stoga se najčešće koriste u mješavinama sa drugim nosačima, najčešće gumama, te prvenstveno sa arapskom gumom (Assadpour i Jafari, 2019; Ballesteros i sur., 2017; Tuan i sur., 2016).

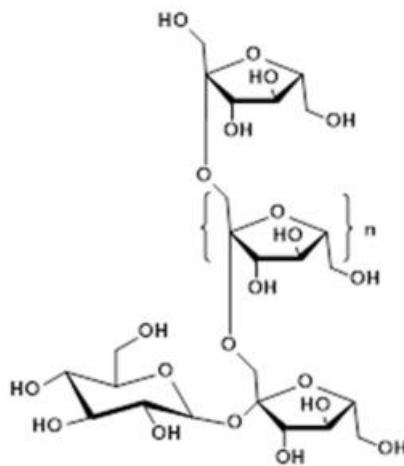
**Arapska guma** je jedina guma sa GRAS statusom. To je jestivi biopolimer D-glukouronske kiseline, L-ramoze, D- galaktoze i L-arabinoze sa oko 2% proteinske strukture (Slika 12). Niski udio proteina joj daje dobra emulgirajuća svojstva zbog kojih se smatra izvrsnim nosačem za inkapsulaciju fenolnih spojeva.



**Slika 12.** Arapska guma - strukturna formula (Ashour i sur., 2022)

Uporaba arapske gume je limitirana njenom visokom cijenom i limitiranom dostupnošću zbog godišnje produkcije od 300 g po stablu akacije i prisutnosti nečistoća u samom nosaču (Poshadri i Kuna, 2010).

**Inulin** spada u fruktooligosaharide. Za razliku od maltodekstrina koji se sastoji isključivo od glukoznih jedinica, inulin se sastoji od fruktoznih jedinica povezanih  $\beta$  (2-1) vezom sa glukozom na kraju lanca (Slika 13) (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011). Jeftin je nosač, bez okusa i mirisa, ima prebiotička svojstva (Kalyani Nair i sur., 2010) i povećava bioiskoristivost kalcija. Zbog svih ovih pozitivnih karakteristika danas se intenzivno istražuje njegova primjena kao nosača u procesima inkapsulacije (Pacheco i sur., 2018; Urzúa i sur., 2017).



**Slika 13.** Inulin - strukturna formula (Afinjuomo i sur., 2021)

#### 2.4.1. Utjecaj omjera nosača i suhe tvari ekstrakta na efikasnost inkapsulacije

Osim odabira vrste optimalnog nosača, omjer nosača i aktivne komponente ekstrakta ima značajan utjecaj na efikasnost inkapsulacije fenolnih spojeva (Akhavan Mahdavi i sur., 2016; Elez Garofulić i sur., 2017; Osamede Airouyuwa i Kaewmanee, 2019; Tchabo i sur., 2019; Tomsone i sur., 2020).

Koncentracija u kojoj se nosač dodaje biljnom ekstraktu prije sušenja značajno utječe na svojstva gotovog praha. Niska koncentracija nosača često nije dovoljna za sprječavanje



ljepljivosti prahova i uzrokuje mali prinos praha, te se smanjuje koncentraciju fenolnih spojeva u prahu zbog neadekvatne termozaštite. Povećanje koncentracije nosača u početku dovodi do povećanja efikasnost inkapsulacije do određene točke (Mohan i sur., 2015). Međutim, visoka koncentracija nosača dovodi do nepoželjnog povećanja sadržaja krute tvari i umanjivanja koncentracije bioaktivnih komponenti u prahu. Stoga je vrlo bitno odrediti optimalnu koncentraciju nosača za pojedini biljni ekstrakt.

Krishnaiah i sur. (2012) ispitivali su utjecaj omjera suhe tvari ekstrakta ploda *Morinda citrifolia* L i nosača (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6) i temperature sušenja od (90 do 140°C) na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u prahu dobivenom inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem. Porast udjela ekstrakta imao je pozitivan utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva u inkapsuliranom prahu te je maksimalna vrijednost zabilježena kod omjera suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2 pri temperaturi od 90°C.

Urzúa i sur. (2017) proveli su optimizaciju inkapsulacije ekstrakta lista masline uz inulin kao nosač, te Shao i sur. (2019) optimiziraju inkapsulaciju polisaharida iz ljekovite gljive *Ganoderma lucidum* te su utvrdili da je u oba slučaja optimalan omjer suhe tvari ekstrakta i nosača 1:2. Kombinacija primjene visokih temperatura sušenja i niskog omjera suhe tvari ekstrakta i nosača uzrokuje smanjenje efikasnosti inkapsulacije fenolnih spojeva što dokazuju brojna istraživanja optimiziranja inkapsulacije biljnih ekstrakata sušenjem raspršivanjem (Elez Garofulić i sur., 2017; Leyva-Jiménez i sur., 2020).

#### **2.4.2. Utjecaj temperature sušenja na inkapsulaciju fenolnih spojeva**

S obzirom na veliku strukturnu raznolikost fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima, temperatura sušenja koja se primjenjuje pri njihovoj inkapsulaciji metodom sušenja raspršivanjem različito utječe na njihovu stabilnost. Neke skupine fenolnih spojeva su izrazito osjetljive na povećanje temperature sušenja, dok neke skupine pokazuju veću termostabilnost. Stoga je bitno uz odabir optimalnog nosača, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta i optimizirati temperaturu sušenja prilikom inkapsulacije fenolnih spojeva za pojedini biljni ekstrakt.

Kraće vrijeme sušenja i manja toplinska degradacija uslijed povećanja temperature sušenja ima za posljedicu povećanje ukupnih fenola. Nadalje, povećanje ukupnih fenola može biti uzorkovano i njihovom polimerizacijom pri višim temperaturama (Mishra i sur., 2014).

Općenito se može konstatirati da se povišenjem temperature sušenja povećava izmjena mase i topline što rezultira povećanjem efikasnosti inkapsulacije fenolnih spojeva i njihovog antioksidacijskog kapaciteta (AOK) što dokazuju brojna istraživanja provedena na biljnim ekstraktima kao npr. na kadulji (*Salvia fruticosa* Miller) (Şahin-Nadeem i sur., 2013), infuziji cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) (Santiago-Adame i sur., 2015), zelenom čaju (Susantikarn i Donlao, 2016), listu konjske rotkvice (*Moringa oleifera* Lam) (Looi i sur., 2019) itd.

Şahin-Nadeem i sur. (2013) ispitivali su utjecaj temperature sušenja (145, 155 i 165°C) i vrste nosača na efikasnost inkapsulacije fenolnih spojeva i njihovu AOK u vodenom ekstraktu kadulje. Povećanje temperature je imalo značajan utjecaj na povećanje inkapsulacije fenolnih spojeva i njihov AOK, dok je optimalna temperatura sušenja bila 155°C.

Tran i Nguyen (2018) ispitivali su utjecaj temperature sušenja (110, 120, 130, 140 i 150°C) i vrste nosača (GA, MD, GA+MD) na inkapsulaciju fenolnih spojeva, flavonoida i njihov AOK u ekstraktu lista limunske trave. Povećanje temperature sušenja uzrokovalo je smanjenje koncentracije fenolnih spojeva i flavonoida. Flavonoidi su fenolni spojevi koji su izrazito osjetljivi na toplinu te je povećanje temperature sušenja uzorkovalo njihovu razgradnju. S druge strane, povećanje temperature sušenja pozitivno je utjecalo na povećanje AOK što se može protumačiti aktivacijom nekih fenolnih spojeva uslijed povišenja temperature. Uzorak s MD pri temperaturi 130°C je imao maksimalnu koncentraciju fenolnih spojeva, flavonoida i najveću AOK.

Suprotno navedenom, neki autori su potvrdili suprotan efekt tj. sniženje AOK uslijed povećanja temperature sušenja ili/i smanjenje efikasnosti inkapsulacije fenolnih spojeva. Do sniženja efikasnosti inkapsulacije fenolnih spojeva pri višim temperaturama može doći zbog pojave ljepljivosti prahova i njegovog taloženja na stijenkama kolone tj. zbog gubitaka tijekom procesa sušenja.

Lourenço i sur. (2020) su ispitivali utjecaj različitih nosača (MD, IN i GA) i temperature sušenja (150 i 190°C) na inkapsulaciju ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta kore ananasa i njihovu AOK. Najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva utvrđena je pri temperaturi od 190°C (MD > GA > IN), dok je povećanje temperature sa 150°C na 190°C

dovelo do smanjenja njihovog AOK kod svih nosača. Kod više temperature (190°C) fenolni spojevi koji pridonose AOK iz ekstrakta kore ananasa lakše oksidiraju.

Tengse i sur. (2017) su ispitivali utjecaj koncentracije ekstrakta zelenog čaja (10-25%) i temperature sušenja (120, 130 i 140°C) na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i njihovu AOK. Povećanje temperature sušenja rezultiralo je smanjenjem inkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva i smanjenjem njihove AOK koja je određena DPPH metodom. Maksimalna inkapsulacija fenolnih spojeva i AOK su ostvareni pri temperaturi od 120°C i maksimalnoj koncentraciji ekstrakta zelenog čaja (25%) uz 40% MD kao nosač.

## 2.5. Mogućnost primjene tekućih i inkapsuliranih ekstrakata cvijeta trnine i buduće perspektive

Sva dosadašnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja bila su fokusirana na istraživanje tekućih ekstrakata cvijeta trnine. Istraživanja antioksidativnog djelovanja fenolnih spojeva cvijeta trnine (Poljska) *in vitro* (Marchelak i sur., 2017) dokazuju njihovu sposobnost uklanjanja DPPH-radikala, redukciju željeznih iona i inhibiciju peroksidacije linolne kiseline i aktivnosti protuupalnih enzima (lipoksigenaze i hijaluronidaze) te učinkovitu zaštitu izolirane ljudske plazme od oštećenja izazvanih peroksinitritom smanjenjem razine biomarkera oksidativnog stresa. Na osnovi dobivenih rezultata zaključeno je sa ekstrakt cvijeta trnine (metanolni ekstrakt) može povećati ukupni antioksidativni kapacitet organizma.

Dikić i sur. (2018) su proveli *in vivo* istraživanje određivanja bioraspoloživosti fenolnih spojeva vodenog ekstrakta cvijeta trnine (jedna akutna doza od 25 mg/kg tjelesne težine ukupnih fenolnih spojeva), u plazmi miševa 15 i 30 minuta te 1, 2, 4, 6 i 24 h. U plazmi miševa detektirali su prisutnost 53,1% u 24 satnom nadzoru od svih spojeva prisutnih u fenolnom ekstraktu cvijeta trnine. Rezultati ovog istraživanja dokazali su dobru biodistribuciju u organima te ukazali na daljnju mogućnost ispitivanja produljenog subkroničnog doziranja koje su Balta i sur. proveli 2 godine kasnije (2020). Provedeno je *in vivo* istraživanje antioksidativnih fizioloških učinaka oralne primjene fenolnih spojeva iz ekstrakata cvijeta trnine na miševima tijekom 28 dana u dnevnim dozama od 25 mg ukupnih fenolnih spojeva po kg tjelesne težine. Sadržaj fenolnih spojeva u tkivima miševa značajno se povećao nakon najmanje tri tjedna oralne primjene. Fenolni profili su bili su različiti u pojedinim tkivima te je dokazana djelomična inhibicija antioksidativnog stresa u njima (Balta i sur., 2020).

Murati i sur. (2019) proveli su *in vitro* antitumorske testove (Trypan Blue i Kenacid Blue) na stanicama hepatokarcinoma (Hepa 1-6) i odgovarajućim ne-neoplastičnim hepatocitima (AML 12) sa etanolnim ekstraktom cvijeta trnine (5-200 µg/mL). Antiproliferativna aktivnost određena je nakon 24 i 72 sata. Inhibicijski učinci na proliferaciju Hepa 1–6 primijećeni su pri svim koncentracijama sa značajnom inhibicijom pri  $\geq 100$  µg/mL određenom s obje metode. Citotoksičnost je također otkrivena u AML 12 sa značajnim dozama iznad 10 µg/mL nakon 72 sata. Gubitak stanične vitalnosti nakon 24 h bio je izraženiji u ne-neoplastičnim u odnosu na stanice hepatokarcinoma, dok je produljena inkubacija (72 h) rezultirala je gotovo jednakom toksičnošću kod obje vrste stanica. Prooksidativno djelovanje

ekstrakta cvijeta trine uočeno je kod obiju vrsta stanica s većim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species* - ROS) u neoplastičnim stanicama. Stanična smrt prvenstveno je bila nekroza zbog čega je potreban oprezan u farmaceutskoj upotrebi i ljudskoj prehrani radi učinka na normale hepatocite.

Sönmez i sur. (2021) istraživali su antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost te sposobnost inhibicije enzima, različitih ekstrakata trnine (metanol, etil-acetat, diklorometan i *n*-heksana). Dobiveni rezultati istraživanja sugeriraju da bi ekstrakti trnine (*Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domain, Turska) i njihove komponente mogli biti potencijal za daljnja istraživanja za nove lijekove iz prirodnih izvora.

Do danas nema istraživanja vezanih uz primjenu inkapsuliranih ekstrakata trnine unatoč evidentnom potencijalu te stoga ovo istraživanje predstavlja značajan znanstveni doprinos u tom segmentu.

U nastavku je dat kratak osvrt na inkapsulirane ekstrakte nekoliko selektiranih biljnih vrsta.

Bernal-Millán i sur. (2022) potvrdili su povećanje stabilnosti i zaštite inkapsuliranih fenolnih spojeva ekstrakta origana (*Lippia graveolens*) metodom sušenja raspršivanjem sa MD, u *in vitro* uvjetima gastrointestinalne probave. Probava *in vitro* sastojala se od 3 koraka koji simuliraju probavu u ustima, želucu i tankom crijevu, oponašajući pH, kemijski sastav probavnih tekućina, temperaturu (37°C) i vrijeme prolaska. Tijekom gastrointestinalne simulacije utvrđena je stabilnost od 85% u intestinalnom stadiju potvrđujući primjenu MD kao adekvatnog nosača.

Ștefănescu i sur. (2022) istraživali su bioraspoloživost fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu i inkapsuliranom ekstraktu od mješavine lišća europske borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), brusnice (*Vaccinium vitis-idaea* L.) i američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) dobivenog metodom sušenja raspršivanjem te su dokazali veću bioraspoloživost inkapsuliranog ekstrakta sa maksimalnom vrijednošću od 45,43%.

Osim primjene u fitoterapiji, biljni ekstrakti imaju široku primjenu i u prehrambenoj industriji. Usljed sve veće zabrinutosti zbog škodljivosti sintetičkih prehrambenih konzervansa (nitriti, sulfiti) i dezinficijensa, na zdravlje ljudi (akutna toksičnost, teratogenost, kancerogenost) i njihovog utjecaja na okoliš zbog spore razgradnje, te sve veće potražnje za organskom hranom i prehrambenih proizvodima koje ne sadrže konzervanse, tijekom

posljednjeg desetljeća intenzivno se istražuju se njihove prirodne alternative. Novi prirodni antimikrobni alternativni konzervansi trebali bi očuvati organoleptička i nutritivna svojstva sirove hrane ili minimalno procesirane hrane te smanjiti njenog bacanje produljenjem roka trajanja. Biljni ekstrakti bogati fenolnim spojevima zbog utvrđenih antimikrobnih djelovanja imaju velik potencijal primjene u obogaćivanju jestivih filma i premaza i za konzerviranje hrane.

Jestivi film je tanki sloj jestivog materijala, koji se može staviti na ili između komponenti hrane te služi kao paket za prehrambeni materijal dok se oblikuje i lije, a zatim se prehrambeni materijal umotava u njega. Stoga djeluje kao primarno pakiranje prehrambenog materijala štiteći ga od mehaničkog stresa (Saxena i sur., 2020). Obogaćivanjem jestivih filmova biljnim ekstraktima, mogu se poboljšati njihova mehaničkih svojstava kao dodatkom ekstrakta zelenog čaja (Siripatrawan i Harte, 2010), ekstrakta lista *Moringa oleifera* (Tesfay i Magwaza, 2017) te ekstrakta gingsena (Dong and Wang, 2018).

Jestivi premaz podrazumijeva tanki sloj jestivog materijala koji se nanosi u tekućem stanju izravno na površinu prehrambenog proizvoda te djeluje kao zaštitna barijera za očuvanje kvalitete prehrambenog materijala.

Yang i sur. (2014) obogatili su jestivi premaz od kitozana ekstraktom lista borovnice koji je smanjio stopu raspadanja svježih borovnica tijekom 35 dana skladištenja. Te su utvrdili da se s povećanjem koncentracije ekstrakta lista borovnice smanjuje stopa propadanja svježih borovnica.

Pagliarulo i sur. (2016) su obogatili kitozan inkapsuliranim ekstraktom božura (*Paeonia rockii*) dobivenog metodom sušenja raspršivanjem, čime su produljili rok trajanja jagoda na oko 16 dana, usporavajući gubitak težine bez bilo kakve značajne promjene njihovih nutritivnih i senzorskih svojstava.

Mogućnost primjene biljnih ekstrakata kao alternativnih prehrambenih aditiva ovisi o biljci koja se koristi kao i njenom dijelu. Stoga ih možemo podijeliti na antioksidanse, antimikrobna sredstva, sredstva za poboljšanje okusa, sredstva za bojenje, enzime, pojačivače hranjivih tvari i aditive za pakiranje. Kao alternativni prehrambeni aditivi uobičajeno se koriste ekstrakt ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), majčine dušice (*Thymus vulgaris*), ekstrakt

bosiljka (*Ocimum basilicum*) te zelenog čaja (*Camellia sinensis* var *Assamica*) zbog antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja (Hosseini and Jafari, 2020).

Iako je primjena biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji je raznolika ona je i limitirana zbog njihove niske stabilnosti i negativnog učinka na organoleptička svojstva hrane tj. okus, miris i/ili boju (Bouarab-Chibane i sur., 2017).

Radi navedenih mogućih negativnih učinaka na organoleptička svojstva tretirane hrane istraživana je i uporaba biljnih ekstrakta iz kojih su uklonjene tvari boje. Nirmal i Benjakul (2011) su istraživali učinak ekstrakta zelenog čaja bez klorofila čijom primjenom se produljuje vrijeme čuvanja pacifičkih bijelih kozica u ledu na moguće organoleptičke promjene te su zaključili da ih uklanjanjem klorofila nije bilo.

Inkapsulacijom biljnih ekstrakata uklanjaju se navedena ograničenja i povećava se njihova primjena.

Sawale i sur. (2017) ispitali su učinak dodatka etanolnog ekstrakta biljke *Terminalia arjuna*, koja se koristi u indijskoj tradicionalnoj fitoterapiji, u slobodnom i inkapsuliranom obliku na stabilnost skladištenja steriliziranih aromatiziranih mliječnih napitka te su bolji senzorski rezultati i stabilnost postignuti je primjenom inkapsuliranog ekstrakta sa MD.

Jolayemi i sur. (2021) usporedili učinke inkapsuliranog i slobodnog ekstrakta lista masline na stabilnost skladištenja preljeva za salatu. Istraživanje je pokazalo veću učinkovitost inkapsuliranog ekstrakta lista masline u zaštiti preljeva za salatu od oksidacijskih pojava i fizičke nestabilnosti kao posljedicu postupnog otpuštanja fenolnih spojeva tijekom skladištenja.

Međutim, u nekim slučajevima biljni ekstrakti dodani u koncentracijama koje učinkovito inhibiraju rast neželjenih mikroorganizama također mogu poboljšati boju ili okus neke hrane. Primjena začina i začinskog bilja za poboljšanje organoleptičkih svojstava mesa i mesnih proizvoda je uobičajena praksa, dok se njihovi biljni ekstrakti također koriste kao alternativni prirodni konzervansi zbog svog antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja (Efenberger-Szmechtyk i sur. 2021).

Od fenolnih spojeva koji su sastavnice fenolnog profila ekstrakta cvijeta trnine dokazano je antimikrobno djelovanje fenolnih kiselina: galne, klorogenske, ferulinske i kafeinske kiseline; flavona luteolina, flavonola kamferola i kvercetina, te flavanola katehina i epikatehina (Adamczak i sur., 2020; Matejczyk i sur., 2018; Pacheco-Ordaz i sur., 2018; Skroza i sur., 2019).

Nadalje biljni ekstrakti mogu se koristiti za obogaćivanje konvencionalne hrane tj. stvaranje novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda uz osiguranje stabilnosti, aktivnosti i bioraspoloživosti bioaktivnih funkcionalnih sastojaka nakon procesiranja i skladištenja (Morais i sur., 2018).

Dosadašnji primjeri primjene inkapsuliranih biljnih ekstrakata u prehrambenim funkcionalnim proizvodima su: ekstrakt lista maline (*Rubus idaeus* L.) u čokoladi (Belščak-Cvitanović i sur., 2012), ekstrakt Mate čaja (*Ilex paraguariensis* L.) (López Córdoba i sur., 2013) u instant povrtnoj juhi, ekstrakt cvijeta divlje kupine (*Rubus ulmifolius* Schott) u jogurtu (Martins i sur., 2014), ekstrakt zelenog čaja u kruhu (Pasrija i sur., 2015) te ekstrakt matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) u kolačima (Caleja i sur., 2018).

Iako se prirodni sastojci tradicionalno koriste stoljećima za njegu kože, oni postaju sve prisutniji u suvremenim kozmetičkim proizvodima (Fowler Jr i sur., 2010) prvenstveno zbog svog antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja te inhibicije tirozinaze (Ribeiro i sur., 2015). U usporedbi sa sintetičkim kozmetičkim sastojcima, prirodni biljni sastojci pokazuju nisku toksičnost, blagi su i biorazgradivi. Njihovi izvori mogu biti biljke koje se pojavljuju u prirodi i nusproizvodi od biljne proizvodnje. Učinak prirodnih sastojaka u proizvodima za njegu kože ovisi o njihovoj *in vitro* i *in vivo* učinkovitosti i vrsti dermatološke podloge u koju su ugrađeni (Fowler Jr i sur., 2010). Primjena biljnih ekstrakata za primjenu na koži je ograničena jer neki od njihovih bioaktivnih spojeva pokazuju visoku hlapljivost, nisku topljivost u vodenim sustavima i/ili kratko vrijeme zadržavanja na koži.

Rejniak i Zielinski (2014) istraživali su antiradikalnu aktivnost ekstrakta cvijeta trnine (Poljska) radi mogućnosti njegove primjene kao kozmetičkog sastojka. Dokazali su bolju antiradikalnu aktivnost 50% etanolnog ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na vodeni ekstrakt.

Prema *Uredbi Europske unije o kozmetici* kozmetički proizvod je definiran kao svaka tvar ili smjesa koja se koristi za vanjske dijelove ljudskog tijela (epidermu, dlake, nokte, usne i vanjske spolne organe), zube i sluznicu usne šupljine za njihovo čišćenje, parfimiranje, promjenu izgleda i/ili ispravljanje tjelesnih mirisa i/ili njihova zaštita ili njihovo održavanje u dobrom stanju (European Parliament i Council of the European Union, 2009). Nadalje, kozmetički proizvodi se mogu grupirati u sedam kategorija: njega i održavanje kože; čišćenje kože; poboljšanje mirisa; uklanjanje dlaka; njega i održavanje kose; njega i održavanje sluznice i dekorativna kozmetika (Ferreira i sur., 2022). Korištenje biljnih bioaktivnih ekstrakata raznih biljaka u kozmetici obavljaju uglavnom dvije funkcije: njegu tijela i kao sastojci koji utječu na



biološke funkcije kože, osiguravajući hranjive tvari za zdravu kožu (Dureja i sur., 2005). Kozmetički proizvodi u svom sastavu mogu sadržavati prirodne ljekovite sastojke koji pokazuju blagotvorno lokalno djelovanje i zaštitu protiv degenerativnih stanja kože te mogu poboljšati tonus, teksturu i blistavost kože uz *anti-age* efekt. Primjer je ekstrakt cvjetova gloja (*Crataegus monogyna* Jacq.) ima tonizirajuće djelovanje na tkivo kože te se primjenjuje u kremama i losionima kao anti-age tretman (Ribeiro i sur., 2015).

Važnost fenolnih antioksidansa značajno je porasla u posljednjem desetljeću zbog njihove visoke sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Zillich i sur., 2015) te se također mogu se koristiti za prevenciju štetnih učinaka UV zračenja na kožu (Ebrahimzadeh i sur., 2014).

Melanin je ljudski pigment odgovoran za boju očiju, kose i kože koji štiti kožu od oštećenja UV zračenjem upijajući ga i uklanjajući reaktivne vrste kisika. Izlaganje kože sunčevom zračenju povećava se sinteza melanina aktivacijom enzima tirozinaze (Gillbro i Olsson, 2011) dok pretjerana aktivnost tirozinaze dovodi do prekomjerne proizvodnje melanina. Povećana akumulacija i sinteza melanina odgovorni su za kožne poremećaje poput melasme, sunčanih pjega i solarnog lentiga (Grimes i sur., 2006). Istraživani su brojni biljni ekstrakti kojima je dokazana sposobnost inhibicije tirozinaze kao što su biljni ekstrakt cvijeta *Inula japonica* (Huang i sur., 2013), lista čička (*Arctium lappa* L.) (Horng i sur., 2017), ekstrakta kore *Magnolia officinalis* (Wu i sur., 2018) te kadulje (Duletić-Laušević i sur., 2019).

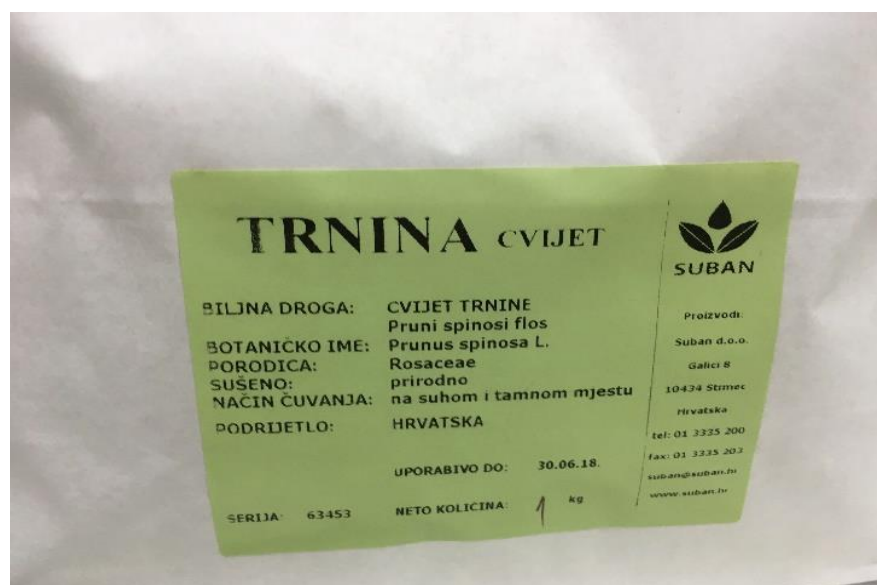
S obzirom na izraženo antioksidativno i antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva cvijeta trnine, tekući i inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine pokazuju veliki potencijal primjene u prehrambenog industriji kao alternativnih prehrambenih aditiva, jestivih filmova te izvora fenolnih spojeva pri stvaranju novih funkcionalnih proizvoda. Nadalje, uz antioksidativno i antimikrobno dokazano je i antikancerogeno djelovala pojedinih fenolnih spojeva cvijeta trnine te njegovi tekući i inkapsulirani ekstrakti imaju veliki potencijal primjene u farmaceutskoj industriji pri izradi dodataka prehrani i lijekova. Budući da kvercetin kao jedan od najvažnijih i najzastupljenijih fenolnih spojeva cvijeta trnine djeluje i kao inhibitor tirozinaze, tekući i inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine imaju široku mogućnost primjene u kozmetičkoj industriji pri tretmanu hiperpigmentacije, uz mogućnost primjene u izradi *anti-age* linija zbog antioksidativnog djelovanja.

## **2. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Biljni materijal

Za ovo istraživanje korišten je cvijet trnine (*Prunus spinosa flos*) nabavljen 2017. godine u suradnji s certificiranom tvrtkom Suban d.o.o. (Strmec, Hrvatska, serija: 63453) (Slika 15). Za potrebe ovog istraživanja prethodno navedena tvrtka cvijet trnine sakupila je na prirodnom staništu na području Republike Hrvatske, a potom su svježiji cvjetovi osušeni prirodnim putem na sjenovitom i prozračnom mjestu.



**Slika 14.** Deklaracija prirodno sušenog cvijeta trnine - Suban d.o.o. Hrvatska (vlastita fotografija, 2017)

#### 3.1.2. Kemikalije i reagensi

Sve korištene kemikalije su bile visoke analitičke čistoće (p.a.).

##### *Ekstrakcija fenolnih spojeva iz cvijeta trnine*

- Destilirana voda
- Metanol, 80%-zni (v/v), HPLC čistoće (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, New York, SAD)

*Određivanje sadržaja vlage*

- Kvarcni pijesak (Gram–mol, Zagreb)

*Inkapsulacija*

- Maltodekstrin (MD) DE 13-17 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Arapska guma (GA) (Acrōs organic, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija) i
- Inulin (IN) (Dukat, Zagreb, Hrvatska)
- redestilirana voda pročišćena na uređaju (MilliQ, Millipore, SAD)
- Metanol, 80%-zni (v/v), HPLC čistoće (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, New York, SAD),
- Etanol (BDH Pro-labo, VWR International, Lutterworth, Engleska)
- Acetonitril, HPLC čistoće (BDH Pro-labo, VWR International, Lutterworth, Engleska)

Mravlja kiselina, HPLC čistoće (BDH Pro-labo, VWR International, Lutterworth, Engleska)

- Standardi fenolnih spojeva:
  - kvercetin-3-glukozid, kamferol-3-rutinozid, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, galna kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, miricetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD);
  - epikatehin, katehin, epigalokatehin galat, epikatehin galat, procijanidin B1, procijanidin B2, apigenin i luteolin (Extrasynthese, Genay, Francuska)
  - kvercetin-3-rutinozid (Acrōs organic, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija).

*Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova cvijeta trnine*

- Metanol, 80%-tni (v/v), HPLC čistoće (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, New York, SAD)

*Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom*

- Fosfatni pufer:  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , (Acros Organics)  
pH 7,  $c = 0.070$  M (slijepa proba)
- Fluorescein ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ), Honeywell Riedel-de-Haën  
*Priprema otopine 1 (F<sub>1</sub>):* Otopi se 0,0225 g fluorescina u 50 ml u 0.070 M fosfatsnog pufera

*Priprema* otopine 2 (F<sub>2</sub>): Iz otopine 1 (F<sub>1</sub>) uzme se 24,5 µL u odmjernu tikvicu od 250 ml i nadopuni do crte sa 0.070 M fosfatnim puferom, te se dobije 0.0703 M otopina fluorescina

- AAPH [2,2'—azobis (2- amidinopropan)-dihidroklorid], Sigma-Aldrich

*Priprema 0,24 mM AAPH otopine:* Izvaže se 0,6508 g AAPH [2,2'—azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid] (Sigma-Aldrich, Stenheim, Njemačka) i preko staklenog lijevka uspe u odmjernu tikvicu od 10 ml i nadopuni do oznake sa fosfatnim puferom (pH 7, c = 0.070 M) i dobro promućka. Važno je pripremiti svaki dan svježu otopinu i to najbolje za vrijeme termostatiranja uređaja na 37°C tj. pola sata prije samog mjerenja. Dobije je 0,24 mM otopina AAPH.

- Trolox® (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Acros Organics

*Priprema:* 0,0025 grama Trolox® (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Njemačka) odvaže se na analitičkoj vagi u lađicu i uspe preko staklenog lijevka u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuni sa fosfatnim puferom (pH 7, c = 0.070 M) do oznake i dobro promućka. Dobivena otopina Troloxa (S<sub>A1</sub> - maksimalne koncentracije) ima koncentraciju 99,88 µM. Iz ove početne otopine Troloksa S<sub>A1</sub> pripremi se 6 razrjeđenja miješanjem omjera standardne otopine i fosfatnog pufera u omjeru 1:2. Tako je koncentracija S<sub>A2</sub> 49,94 µM (1ml S<sub>A1</sub>-otopine i 1ml fosfatnog pufera), S<sub>A3</sub> 24,97 µM (1ml S<sub>A2</sub>- otopine i 1ml fosfatnog pufera), S<sub>A4</sub> 12,485 µM (1ml S<sub>A3</sub>- otopine i 1ml fosfatnog pufera), S<sub>A5</sub> 6,2425 µM (1ml S<sub>A4</sub>-otopine i 1ml fosfatnog pufera) i S<sub>A6</sub> 3,12125 µM (S<sub>A6</sub> – minimalna koncentracija) (1ml S<sub>A5</sub> otopine i 1ml fosfatnog pufera). Za izradu baždarnog pravca koristi se fluorescencijsko mjerenje navedenih koncentracija Troloxa.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

*Ekstrakcija fenolnih spojeva iz cvijeta trnine*

- Staklene čaše (50 mL - 500 mL)
- Tehnička vaga Mettler (točnost ±0,01g)
- Menzure (50 mL - 500 mL)
- Stakleni lijevci

- Stakleni štapić
- Filter papir
- Ultrazvučna kupelj *Elmasonic S 40H* (Elmasonic, Singen, Njemačka)
- Magnetski mješači
- Odmjerna tikvica (1000 mL)
- Sabina posuda za ekstrakt

#### *Određivanje sadržaja vlage*

- Aluminijske posudice za vaganje s poklopci
- Stakleni štapić
- Sušionik
- Eksikator
- Analitičkoj vaga (Sartorius AZ 214, *M-Power series Analytical Balance*) s točnošću  $\pm 0,0002$  g
- Pipete 2 mL

#### *Inkapsulacija*

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Staklene čaše od 150 ml
- Magnetska miješalica *HSC Ceramic Hot Top-Plate Stirrer* (Velp, Italija)
- Sušionik s raspršivanjem *Lab-Plant SD-60* (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL

#### *Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova cvijeta trnine*

- Epruete
- Stakleni štapići
- Ultrazvučna kupelj *Elmasonic S 40H* (Elmasonic, Singen, Njemačka)
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Odmjerne tikvice od 10 ml

- 0.45  $\mu\text{m}$  mikrofilter (Machery-Nagel, Germany) u
- Vialle od 2 ml
- Zamrzivač - skladištenje na  $-60^{\circ}\text{C}$

#### *Određivanje fenolnih spojeva UPLC-MS/MS metodom*

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipeta (5 mL-10 mL) i propipeta
- Ultrazvučna kupelj *Elmasonic S 40H* (Elmasonic, Singen, Njemačka)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Filter papir
- Odmjerne tikvice od 10 mL
- Mikrofilteri od 0,45  $\mu\text{m}$  (Machery-Nagel, Dueren, Njemačka)
- UPLC-MS/MS uređaj Agilent serije 1290 RRLLC spojenog s Agilent 6430 Triple Quadropole LC/MS masenim spektrometrom (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, (Agilent Technologies, Kalifornija, SAD)
- Statistički program Statsoft STATISTICA v. 12 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA)

#### *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom*

- Analitička vaga (Sartorius Quintix model 224-1S)
- Mikropipete Eppendorf (100  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$ )
- Mikrotitarski čitač pločica CLARIOstar (BMG LABTECH, *The Microplate Rider Company*, Offenburg, Germany) sa Costar® 96 crnim neprozirnim mikrotitarskim pločama, Corning Costar
- Vialle od 10 ml
- Mikropipete volumena 100  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice od 10 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml i 1000 ml
- Plastična lađica za vaganje

- MARS 2.0 *Data analysis software* - programski paket za čitanje i fotografiranje mikrotitarskih pločica (BMG LABTECH, *The Microplate Rider Company*, Offenburg, Germany)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*)

Ekstrakcija cvijeta trnine provedena je sukladno prethodno definiranim optimalnim uvjetima koje su odredili Lovrić i suradnici (2017).

Ekstrakt cvijeta trnine korišten za istraživanje dobiven je tako da se 75 g prirodno sušenog cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) pomiješa sa 500 mililitara destilirane vode, a ekstrakcija se provodi u ultrazvučnoj kupelji *Elmasonic S 40H* pri temperaturi od 50°C u trajanju od 20 minuta, pri frekvenciji od 37 kHz. Nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE, engl. *Ultrasound Assisted Extraction*) dobiveni vodeni ekstrakt filtrira se preko filter papira u odmjernu tikvicu volumena 1 litre. Ukupni volumen dobivenog ekstrakta podešen je do oznake s vodom kao ekstrakcijskim otapalom, nakon čega je određena suha tvar početnog ekstrakta kako bi se izračunali omjeri volumena ekstrakta i nosača koji se koriste pri provođenju postupka inkapsulacije. Vodeni ekstrakt cvijeta trnine skladišten je pri +4°C do trenutka provođenja analiza (do maksimalno 7 dana).



### 3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari u početnom ekstraktu cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) i sadržaja vlage u inkapsuliranim ekstraktima

Suha tvar ekstrakta cvijeta trnine određena je kako bi se mogle izračunati mase nosača koje je potrebno dodati u 100 ml vodenog ekstrakta cvijeta trnine, te kako bi se zadovoljili omjeri nosača i suhe tvari ekstrakta definirani prethodnim planom eksperimenta (Tablica 1).

U osušene i prethodno izvagane aluminijske posudice s poklopcem stavi se oko 1g sitno zrnatog kvarcnog pijeska (Gram–mol, Zagreb) i stakleni štapić, te suši u sušioniku na  $105^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  oko 2 sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudice se zatvore poklopcem, te hlade oko 1 sat u eksikatoru. Nakon hlađenja odredi se masa posuda na analitičkoj vagi (Sartorius AZ 214, M-Power series Analytical Balance) s točnošću  $\pm 0,0002$  g.

U ohlađene i izvagane posudice s pijeskom, stavi se oko 2 ml ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića, te sve zajedno izvaže na analitičkog vagi. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se sušiti na  $105^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  1 sat sa zaklopljenim poklopcem. Nakon sušenja, hlađenja u eksikatoru i ponovnog vaganja, sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja (u razmaku od pola sata) nije manja od 0,001 g.

Određivanje ukupne suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine provedeno je na isti način kao i u ekstraktima s tim da je umjesto 2 ml ekstrakta odvagano 0,5 g praha.

Ukupna suha tvar izračunava se prema formuli:

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

gdje je:

**m<sub>0</sub>** – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g)

**m<sub>1</sub>** – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g)

**m<sub>2</sub>** – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

Za inkapsulirane ekstrakte sadržaj vlage se izračuna kao:

$$\text{sadržaj vlage (\%)} = 100 - \text{ukupna suha tvar}$$

### 3.2.3. Inkapsulacija fenolnih spojeva vodenog ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) metodom sušenja raspršivanjem

Inkapsulacija fenolnih spojeva iz početnog ekstrakta ekstrakta cvijeta trnine metodom sušenja raspršivanjem provedena je na laboratorijskom uređaju za sušenje raspršivanjem *Lab-Plant SD-60* (Velika Britanija) (Slika 16).

Prema punom faktorijalnom dizajnu proizvedeno je 45 prahova na različitim temperaturama (120, 150 i 180 °C), sa različitim omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5:1, 1:1 i 2:1) te uz primjenu pet različitih nosača MD, MD+25%GA, MD+50%GA, MD+25%IN i MD+50%IN.

Kako je prikazano u planu eksperimenta u Tablici 1, inkapsulacija ekstrakta cvijeta trnine provedena je sušenjem raspršivanjem primjenom 5 različita nosača: maltodekstrina (MD) dekstroznog ekvivalenta 13-17 (MD 13-17 DE), mješavine MD i 25% arapske gume (GA) (MD+25%GA), mješavine MD+50%GA, mješavine MD i 25% inulina (IN) te mješavine MD+50%IN. Promjenjive varijable u planu eksperimenta uz vrstu nosača je i omjer nosača i suhe tvari početnog vodenog ekstrakta od (0.5, 1 i 2) te temperatura sušenja (120, 150 i 180°C).

**Tablica 1.** Plan eksperimenta inkapsulacije fenolnih spojeva vodenog ekstrakta cvijeta trnine metodom sušenja raspršivanjem uz primjenu 5 različitih nosača

Pokus br.	Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)
1	MD	0,5	120
2			150
3			180
4		1	120
5			150
6			180
7		2	120
8			150
9			180

10	MD + 25% GA	0,5	120
11			150
12			180
13		1	120
14			150
15			180
16		2	120
17			150
18			180
19	MD + 50% GA	0,5	120
20			150
21			180
22		1	120
23			150
24			180
25		2	120
26			150
27			180
28	MD + 25% IN	0,5	120
29			150
30			180
31		1	120
32			150
33			180
34		2	120
35			150
36			180
37	MD + 50% IN	0,5	120
38			150
39			180
40		1	120
41			150
42			180
43		2	120
44			150
45			180

Na osnovu udjela suhe tvari u početnom vodenom ekstraktu cvijeta trnine izračunate su mase nosača (MD, MD+25%GA, MD+50%GA, MD+25%IN i MD+50%IN) koje treba dodati u 100 ml primarnog vodenog ekstrakta cvijeta trnine prije provođenja postupka inkapsulacije fenolnih spojeva vodenog ekstrakta cvijeta trnine metodom sušenja raspršivanjem prema planu pokusa (Tablica 1).

Sukladno planu eksperimenta, u staklenu čašu od 150 ml odvajana je masa nosača te je pomiješana sa 100 mL vodenog ekstrakta cvijeta trnine. Smjesa nosača i vodenog ekstrakta cvijeta trnine homogenizirana je uz pomoć magnetske miješalice *HSC Ceramic Hot Top-Plate Stirrer* (Velp, Italija) pri temperaturi od 50°C u trajanju od 30 minuta. Homogenizirana smjesa je zatim inkapsulirana na laboratorijskom sušioniku s raspršivanjem sa specifikacijama prikazanim u Tablici 2.

**Tablica 2.** Specifikacija sušionika s raspršivanjem *Lab-Plant SD-60*

<b><i>Raspršivač</i></b>	Promjer mlaznice 1 mm, istosmjerni
<b><i>Kapacitet sušenja</i></b>	1000 – 1500 ml/h
<b><i>Temperaturni raspon</i></b>	50 -250 °C
<b><i>Protok zraka</i></b>	15 – 30 m <sup>3</sup> /h
<b><i>Kompresor</i></b>	2 m <sup>3</sup> /h pri 2 bara – 1.7 m <sup>3</sup> /h pri 4 bara
<b><i>Grijač</i></b>	3 kW
<b><i>Pumpa</i></b>	Peristaltička , podesive brzine
<b><i>Igla za deblokiranje mlaznica</i></b>	Automatska, 3 brzine
<b><i>Dimenzije</i></b>	1110 * 825 * 600 mm
<b><i>Težina</i></b>	80 kg

Izvor: Specifikacija uređaja *Lab-plant SD-60*

Sušenje raspršivanjem za sve uzorke provedeno je pri sljedećim konstantnom parametrima: protoku zraka od 3,5 m/s; srednjoj brzini deblokiranja mlaznice i protoku ulaznog materijala 485 ml/h; te temperaturi izlaznog zraka od 60 do 80°C.

Nakon inkapsulacije sušenjem raspršivanjem dobiveni prah je prikupljen u sabirnoj boci na dnu ciklona i prebačen u plastičnu falkonicu. U dobivenim prahovima određena je ukupna suha tvar prema metodi koja je opisana u poglavlju 3.2.2.



**Slika 15.** Sušionik s raspršivanjem *Lab-Plant SD-60* (Velika Britanija) (vlastita fotografija, 2017)

Prahovi ekstrakta cvijeta trine proizvedeni sušenjem raspršivanjem prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. su do provođenja analiza skladišteni u plastičnim posudama u hladnjaku pri temperaturi 4°C.

### 3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*)

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova cvijeta trnine dobivenih metodom sušenja raspršivanjem provedena je odmah nakon njihove inkapsulacije sušenjem raspršivanjem.

U  $1 \text{ g} \pm 0,001\text{g}$  praha dobivenog sušenjem raspršivanjem dodano je 6 ml 80% otopine metanola (HPLC grade, J.T. Baker, USA) u epruvetu, pomiješano staklenim štapićem i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji *Elmasonic S 40 H* pri temperaturi od  $50^{\circ}\text{C}$  kroz 15 minuta pri frekvenciji od 37 kHz. Nakon ekstrakcije u 80% metanolu, dobiveni ekstrakt je profiltriran preko staklenog lijevka i filter papira u odmjernu tikvicu od 10 ml te nadopunjen otapalom do oznake.



**Slika 16.** Metanolni ekstrakti cvijeta trnine (vlastita fotografija, 2017)

Dobiveni metanolni ekstrakt cvijeta trnine (Slika 17) se profiltrira kroz  $0.45 \mu\text{m}$  mikrofilter (Machery-Nagel, Germany) u vialu od 2 ml i skladišti na  $-60^{\circ}\text{C}$ . Ovako pripremljeni metanolni ekstrakti cvijeta trnine koriste se za određivanje fenolnih spojeva primjenom UPLC-MS/MS metode te antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.

### 3.2.5. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa flos*) primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*) se temelji na gradijentnoj eluciji pri čemu se ekstrahirani fenolni spojevi eluiraju u nizu padajuće polarosti.

Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine provedena je prema metodi koju su prethodno opisali Elez Garofulić i sur. (2018), prema kromatografskim uvjetima i gradijentu prikazanim u Tablicama 3 i 4.

**Tablica 3.** Kromatografski uvjeti metode za određivanje fenolnih spojeva

<b><i>Kolona</i></b>	ZorbaxEclipse Plus C18 1.8 µm (100 * 2.1 mm I.D.)
<b><i>Pokretna faza</i></b>	otapalo <b>A</b> : 0,1% mravlja kiselina u redestiliranoj vodi
	otapalo <b>B</b> : 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu
<b><i>Detektor</i></b>	MS/MS trostruki kvadropol (QqQ)
<b><i>Ionski izvor</i></b>	ESI
<b><i>MS parametri</i></b>	temperatura plina: 300°C
	protok plina (N <sub>2</sub> ): 11 L/min
	nebulizer: 40 psi
	napon na kapilari: + 4000V; - 3500 V
	maseni detektor: DMRM mode (m/z od 50 do 1000)
<b><i>Eluiranje</i></b>	gradijentno – gradijent prikazan u Tablici 4.
<b><i>Temperatura</i></b>	35°C
<b><i>Vrijeme trajanja</i></b>	12,5 min
<b><i>Injektirani volumen</i></b>	2,5µL

**Tablica 4.** Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva

<i>t (min)</i>	<i>otapalo A</i>	<i>otapalo B</i>	<i>protok (ml/min)</i>
0	95	5	0,4
10	65	35	0,4
10,1	20	80	0,4
11	20	80	0,4
11,1	95	5	0,4
12,5	95	5	0,4

Identifikacija fenolnih spojeva u metanolnom ekstraktu cvijeta trnine provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom vrijednosti masenih iona ( $m/z$ ) i fragment iona ( $m/z$ ) koji su specifični za svaki spoj. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja prikazanih u Tablici 5.

Identifikacija spojeva za koje nisu bili dostupni referentni standardi, provedena je usporedbom podataka o spektru masa, usporedbom njihovih molekularnih i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija spojeva za koje nisu bili dostupni komercijalni standardi provedena je na slijedeći način: neoklorogena kiselina je kvantificirana prema kalibracijskoj krivulji klorogenske kiseline; 3-*p*-kumaroilkina i 4-*p*-kumaroilkina kiselina prema kalibracijskoj krivulji *p*-kumarinske kiseline; feruloilkina kiselina prema kalibracijskoj krivulji ferulinske kiseline; kampferol-ramnozid-heksozid, pentozid-heksozid, pentozid, 3-heksozid, ramnozid i acetil-heksozid prema kalibracijskoj krivulji kampferol-3-rutinozida; kvercetin pentozid, acetilheksozid i ramnozid prema kalibracijskoj krivulji kvercetin-3-glukozida; kvercetin acetil-rutinozid i izoramnetin-rutinozid prema kalibracijskoj krivulji kvercetin-3-rutinozida i apigenin pentozid prema kalibracijskoj krivulji apigenina.

Dobivene masene koncentracije (mg/L) svih fenolnih spojeva preračunate su na masu suhe tvari ekstrakta (mg/100g s.tv.e.), kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.



**Tablica 5.** Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedinačne fenolne kiseline, flavonole, flavonole i flavone

<i>Naziv standarda</i>	<i>Jednadžba baždarnog pravca</i>	<i>Koeficijent determinacije (R<sup>2</sup>)</i>
<b><i>Fenolne kiseline</i></b>		
<i>Galna kiselina</i>	Y = 480,65 X	0,8581
<i>Klorogenska kiselina</i>	Y = 2056,2 X	0,9399
<i>Ferulinska kiselina</i>	Y = 368,81 X	0,8827
<i>Kafeinska kiselina</i>	Y = 973,30 X	0,8574
<i>p-kumarinska kiselina</i>	Y = 994,29 X	0,9375
<b><i>Flavonoli</i></b>		
<i>Kvercetin-3-glukozid</i>	Y = 3224,50 X	0,947
<i>Kvercetin-3-rutinozid</i>	Y = 1477,80 X	0,909
<i>Kaemferol-3-rutinozid</i>	Y = 3452,00 X	0,924
<b><i>Flavanoli</i></b>		
<i>Procijanidin B<sub>1</sub></i>	Y = 55,582 X	0,9926
<i>Procijanidin B<sub>2</sub></i>	Y = 69,972 X	0,9952
<i>Katehin</i>	Y = 2935,3 X	0,9741
<i>Epikatehin</i>	Y = 2776,2 X	0,8869
<i>Epikatehin galat</i>	Y = 1101,6 X	0,8700
<i>Epiglokatehin galat</i>	Y = 2873,1 X	0,9711
<b><i>Flavoni</i></b>		
<i>Miricetin</i>	Y = 212,42 X	0,9962
<i>Luteonin</i>	Y = 1292,9 X	0,9550
<i>Apigenin</i>	Y = 1684,5 X	0,9603

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (AOK) ekstrakata cvijeta trnine ORAC metodom

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata cvijeta trnine korištena je ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda koju su opisali Prior i sur. (2005) i Bender i sur. (2015) uz male modifikacije.

ORAC metoda mjeri inhibiciju AAPH peroksil radikala, pri čemu je izvor radikala najčešće azo-spoj AAPH (2,2'-azobis (2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se pri 37°C raspada stalnom brzinom stvarajući peroksil radikale (Prior i sur., 2005). Valne duljine pri kojima se provode mjerenja su 485 nm i 520 nm (Prior, 2015). Antioksidacijski kapacitet se izražava kao razlika površine ispod krivulja za uzorak i slijepu probu tj. preko ukupne površine ispod krivulje pada relativnog intenziteta fluorescencije izraženog u postocima u ovisnosti o vremenu izraženim u minutama (engl. *Area Under the Curve*, AUC) (Garrett, A. R., Murray, B. K., Robison, R. A., & O'Neill, 2010; Prior i sur., 2005). Kao standardna otopina se koriste različite koncentracije otopine sintetskog antioksidans *Trolox* (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) derivat vitamina E topiv u vodi.

#### *Postupak određivanja*

Različita razrjeđenja *Trolox* standarda i uzoraka, te sam pufer odpipetiraju se mikropipetom u jažice crne neprozine mikrotitarske ploče *Costar*® 96, tako da svaka jažica sadrži 150  $\mu$ l otopine fluorescina ( $F_2$ ) u koju se doda 25  $\mu$ L standardne otopine *Troloxa* (razrjeđenja, u svaku 1 razrjeđenje) ili 25  $\mu$ l razrjeđenja uzorka ili 25  $\mu$ l fosfatnog pufera koji služi kao slijepa proba. Nakon insertiranja mikrotitarske ploče u uređaj vrši se inkubacija u trajanju od oko 30 minuta na 37°C. Dok traje inkubacija priprema se svježa otopina AAPH. Nakon postignute konstantne temperature od 37°C injektira se softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača 25  $\mu$ l 240 mM AAPH i svakih 90 sekundi se mjeri promjena intenziteta fluorescencije spektrofluorimetrom na  $\lambda_{eks} = 485$  nm i  $\lambda_{eks} = 520$  nm. Mjerenje ukupno traje 90 minuta.

ORAC analiza provedena je na uređajem CLARIOstar, dok je za analizu podataka korišten MARS 2.0 Software koji omogućuje automatsku evaluaciju.

ORAC vrijednosti su izražene u milimolima Trolox ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta (mmol TE/100g s.tv.e.).

### 3.3. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tusla SAD). Plan pokusa dizajniran je kao mješoviti puni faktorijski dizajn pri čemu su promatrane tri nezavisne varijable (faktora), vrsta nosača, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperatura, dok su kao zavisne varijable promatrani sadržaj vlage, koncentracije pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva te ORAC vrijednosti. Normalnost i homoskedastičnost raspodjele podataka su provjerene Shapiro-Wilks i Levene testovima pri čemu su normalno distribuirani i homoskedastični podaci analizirani multifaktorskom i one - way ANOVO-om, te je usporedba marginalnih h prosjeka provedena *post-hoc* Tukey testom, dok su podatci s odstupanjem od normalne distribucije analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. Razina značajnosti korištena u svim testovima je bila  $p < 0,05$  (\*), a rezultati statističke analize su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Za potrebe optimizacije postupka inkapsulacije za svaki primijenjeni tip nosača korištena je metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology* – RSM) i metoda poželjnosti (eng. *Desirability Method*). Generirane su trodimenzionalne odzivne površine za sadržaj vlage, sadržaj pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet. Valjanost cijelog kvadratnog empirijskog modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom analize varijance na 95%-tnoj razini vjerojatnosti. Prilikom optimizacije inkapsulacijskih parametara postavljene su preferencije za svaku promatranu izlazu varijablu. Za koncentracije pojedinačnih, ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet (ORAC) postavljena je visoka poželjnost (1,0), a za sadržaj vlage niska (0,0), dok su ulazni parametri (omjer nosača i suhe tvari ekstrakta te temperatura) promatrani u šest koraka.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Rezultati određivanja sadržaja vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja sadržaja vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine (Poglavlje 3.2.2.) proizvedenim prema planu pokusa pri čemu su varirane vrste nosača, omjeri suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja (Tablica 6).

**Tablica 6.** Sadržaj vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature sušenja

NOSAČ	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T <sub>sušenja</sub> (°C)	Vlažnost (%)
MD	0,5	120	10,15 ± 0,27
		150	8,54 ± 0,28
		180	7,69 ± 0,11
	1	120	5,36 ± 0,12
		150	5,95 ± 0,23
		180	4,68 ± 0,14
	2	120	3,99 ± 0,06
		150	3,68 ± 0,11
		180	2,53 ± 0,10
MD + 25% GA	0,5	120	8,45 ± 0,38
		150	8,21 ± 0,27
		180	8,66 ± 0,44
	1	120	6,46 ± 0,30
		150	6,10 ± 0,18
		180	4,95 ± 0,07
	2	120	6,98 ± 0,31
		150	3,99 ± 0,11
		180	3,77 ± 0,14
MD + 50% GA	0,5	120	10,40 ± 0,40
		150	8,53 ± 0,19
		180	10,16 ± 0,33
	1	120	7,47 ± 0,35
		150	9,43 ± 0,48
		180	5,34 ± 0,16
	2	120	5,47 ± 0,25
		150	4,52 ± 0,17
		180	3,87 ± 0,05
MD + 25% IN	0,5	120	11,28 ± 0,44
		150	9,51 ± 0,43
		180	9,21 ± 0,19
	1	120	7,23 ± 0,37
		150	5,87 ± 0,13
		180	5,59 ± 0,11
	2	120	5,82 ± 0,19
		150	3,23 ± 0,12
		180	1,96 ± 0,03

MD + 50% IN	0,5	120	9,28 ± 0,36
		150	8,17 ± 0,12
		180	6,91 ± 0,18
	1	120	7,16 ± 0,16
		150	4,41 ± 0,24
		180	4,39 ± 0,17
	2	120	3,65 ± 0,05
		150	2,51 ± 0,05
		180	2,05 ± 0,05

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, udio vlage u PECT određen je u rasponu od 1,96-11,28%. Najniži i najviši udio vlage određen je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%IN, pri čemu je najniži udio vlage 1,96% određen pri 180°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 2:1, a najveći udio vlage 11,28% u uzorku sušenom pri temperaturi od 120°C, s omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Upravo je navedeni nosač pokazao najveću varijabilnost u sadržaju vlage, dok se općenito može uočiti da je sadržaj vlage bio niži u prahovima proizvedenim pri višoj temperaturi s većim udjelom nosača.

Da bi se utvrdila značajnost utjecaja procesnih parametara (vrste nosača, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja) na sadržaj vlage u PECT, provedena je statistička analiza čiji su rezultati prikazani u Tablici 7.

**Tablica 7.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na sadržaj vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

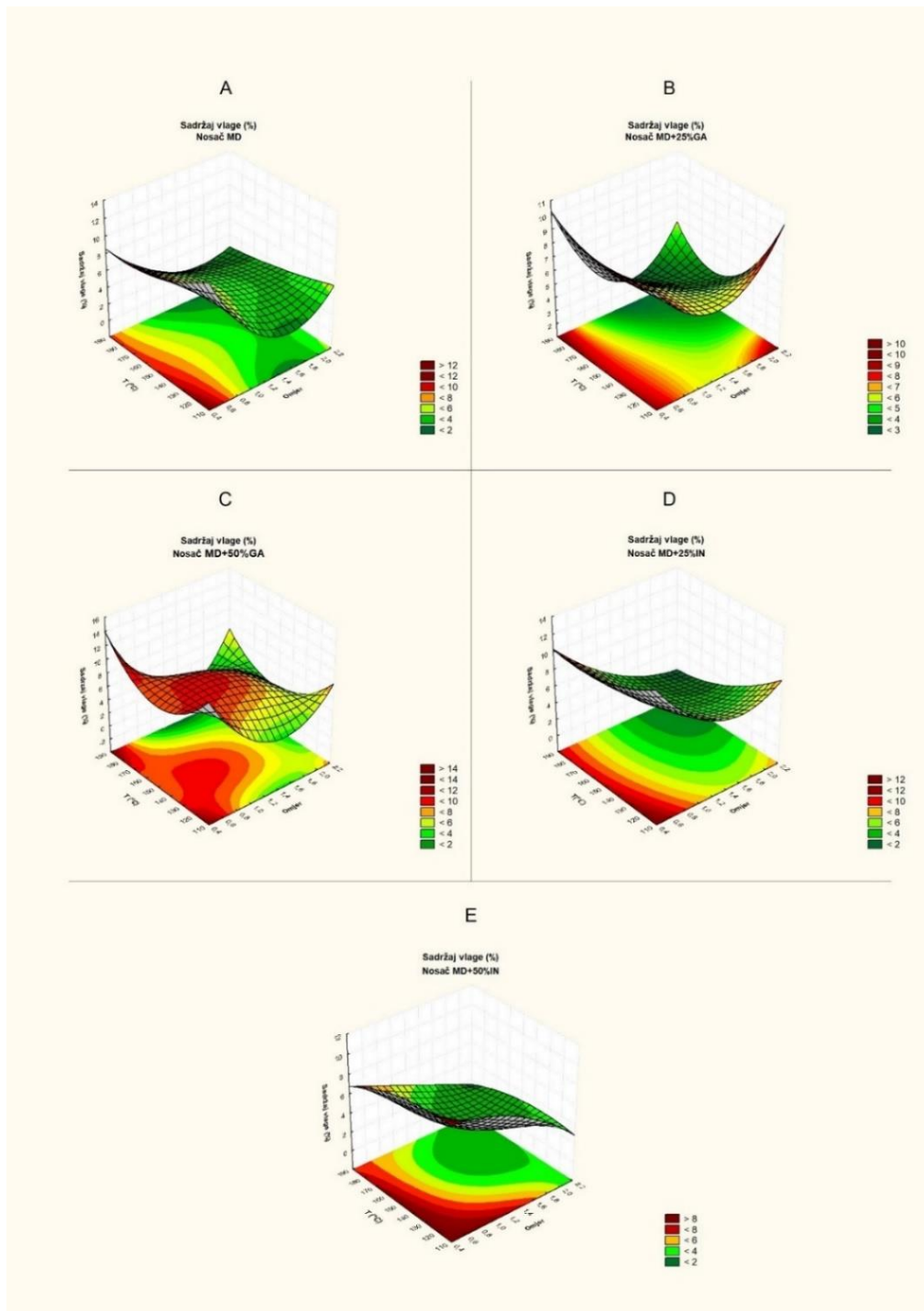
Parametri inkapsulacije	Sadržaj vlage (%)
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p=0,22</b>
MD	5,84±0,57 <sup>a</sup>
MD+25% GA	6,40±0,43 <sup>a</sup>
MD+50% GA	7,24±0,58 <sup>a</sup>
MD+25% IN	6,63±0,69 <sup>a</sup>
MD+50% IN	5,39±0,59 <sup>a</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv. ekstrakta</b>	<b>p&lt;0,01*</b>
0,5	9,01±0,21 <sup>c</sup>
1	6,03±0,25 <sup>b</sup>
2	3,87±0,25 <sup>a</sup>

Temperatura (°C)	p=0,02*
120	7,28±0,41 <sup>b</sup>
150	6,18±0,43 <sup>ab</sup>
180	5,45±0,46 <sup>a</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Utjecaj omjera nosača i suhe tvari ekstrakta, te temperature sušenja na sadržaj vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine bio je statistički značajan ( $p \leq 0,05$ ) dok vrsta nosača nije pokazala statistički značaj (Tablici 7). Minimalan sadržaj vlage postignut je u prahovima dobivenim pri najvećem omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta (2:1) te pri najvišoj temperaturi sušenja (180°C). Nadalje maksimalan sadržaj vlage postignut je u prahovima dobivenim pri najmanjem omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5:1) i pri najnižoj temperaturi od 120°C.

#### 4.2. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine



**Slika 17.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za sadržaj vlage u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja



Metodologija odzivnih površina (RSM) je prikladna metoda za projektiranje, poboljšanje i formuliranje parametara procesa za razvoj novih proizvoda i za modificiranje svojstava trenutnih proizvoda radi boljeg zadržavanja njihovog fizikalno-kemijskog, nutritivnog i kemijskog sastava (Balasubramani i sur. 2013). Navedena metodologija u ovom istraživanju primijenjena je za optimizaciju procesa.

U skladu sa rezultatima određivanja sadržaja vlage na Slici 19 su dani trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za sadržaj vlage za svaki tip nosača u ovisnosti omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te temperature sušenja. Iz navedenih prikaza se može uočiti pravilan trend smanjenja sadržaja vlage s povišenjem temperature sušenja i udjela nosača u inkapsuliranom ekstraktu za nosače MD, MD+50%GA, MD+25%IN i MD+50%IN, dok je kod MD+25%GA utjecaj omjera nosača i ekstrakta bio slabije izražen.

**Tablica 8.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela sadržaja vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$94,903 - 172,111 X_1 + 61,574 X_1^2 - 1,010 X_2 + 0,003 X_2^2 + 2,056 X_1X_2 - 0,006 X_1X_2^2 - 0,747 X_1^2X_2 + 0,002 X_1^2X_2^2$	0,997	0,995
<b>MD+25% GA</b>	$59,059 - 112,009 X_1 + 52,901 X_1^2 - 0,682 X_2 + 0,002 X_2^2 + 1,495 X_1X_2 - 0,005 X_1X_2^2 - 0,706 X_1^2X_2 + 0,002 X_1^2X_2^2$	0,988	0,978
<b>MD+50% GA</b>	$266,984 - 528,180 X_1 + 200,375 X_1^2 - 3,539 X_2 + 0,012 X_2^2 + 7,291 X_1X_2 - 0,025 X_1X_2^2 - 2,779 X_1^2X_2 + 0,009 X_1^2X_2^2$	0,992	0,986
<b>MD+25% IN</b>	$50,8075 - 43,8918 X_1 + 16,5850 X_1^2 - 0,4231 X_2 + 0,0012 X_2^2 + 0,3613 X_1X_2 - 0,0010 X_1X_2^2 - 0,1459 X_1^2X_2 + 0,0004 X_1^2X_2^2$	0,996	0,992
<b>MD+50% IN</b>	$-53,5134 + 164,0174 X_1 - 64,9040 X_1^2 + 0,9197 X_2 - 0,0031 X_2^2 - 2,3166 X_1X_2 + 0,0076 X_1X_2^2 + 0,8937 X_1^2X_2 - 0,0029 X_1^2X_2^2$	0,997	0,995

Koeficijenti determinacije modela (R<sup>2</sup>) i prilagođeni koeficijenti determinacije modela (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za predviđanje vrijednosti sadržaja vlage u PECT, čije su jednadžbe prikazane u Tablici 8, visoki su za svih pet nosača te iznose kako slijedi: 0,997 (R<sup>2</sup>) i 0,995 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,988 (R<sup>2</sup>) i 0,978 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% GA; 0,992 (R<sup>2</sup>) i 0,986 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% GA; 0,996 (R<sup>2</sup>) i 0,992 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% IN i 0,997 (R<sup>2</sup>) i 0,995 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% IN, što upućuje na prikladnost modela za opisivanje i predviđanje sadržaja vlage u PECT u ovisnosti o inkapsulacijskim parametrima (omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja).

**Tablica 9.** Optimizacija metodom poželjnosti sadržaja vlage (%) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (%)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	2	180	2,53	0,991
<b>MD+25% GA</b>	1,75	180	3,28	1,000
<b>MD+50% GA</b>	1,75	180	3,21	1,000
<b>MD+25% IN</b>	2	180	1,96	0,998
<b>MD+50% IN</b>	1,75	180	2,05	0,995

Stupanj poželjnosti za sadržaj vlage (Tablica 9) varirao je od 0,991 do 1,000 ukazujući na iznimno visoku, gotovo 100%-tnu mogućnost optimizacije navedenog parametra variranjem inkapsulacijskih uvjeta. Neovisno o vrsti nosača, optimalna temperatura za inkapsulaciju ekstrakata s najnižim sadržajem vlage je 180°C, što je ujedno i najviša primijenjena temperatura u istraživanju. Najniži udio vlage ostvaruje se primjenom nosača MD+25% IN.

### 4.3. Rezultati kromatografskog određivanja sadržaja i sastava fenolnih spojeva ekstrakta cvijeta trnine

**Tablica 10.** Identifikacijski parametri i raspon koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva izoliranih iz ekstrakata cvijeta trnine inkapsuliranih različitim uvjetima sušenja raspršivanjem određenih primjenom masene spektroskopije

	Fenolni spojevi	Konusni napon (V)	Kolizijska energija (V)	Vrsta ionizacije	Prekursor ion ( <i>m/z</i> )	Fragment ion ( <i>m/z</i> )	Koncentracija (mg/100g s.tv.e.)	
							min	max
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>								
1	3- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina (neoklorogena kiselina)	80	10	-	353	191	nd	167.13 ± 4.63
2	4- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina	80	10	-	353	191	nd	175.42 ± 4.86
3	3- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	80	10	-	337	163	73.55 ± 3.03	276.40 ± 7.98
4	5- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	80	10	-	337	173	12.96 ± 0.53	44.22 ± 1.60
5	Klorogenska kiselina*	80	10	-	353	191	11.76 ± 0.18	73.67 ± 2.14
6	<i>O</i> -feruloilkina kiselina	80	5	-	367	193	39.16 ± 1.61	172.06 ± 4.77
7	Kafeinska kiselina*	80	10	-	179	135	140.27 ± 2.00	694.96 ± 9.93
8	4- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	80	10	-	337	173	nd	130.27 ± 3.61
9	Ferulinska kiselina*	80	5, 10	-	193	178, 134	3.87 ± 0.16	14.35 ± 0.40
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>								
10	Galna kiselina*	100	10	-	169	125	0.77 ± 0.01	17.47 ± 0.50
<b>Flavanoli</b>								
11	Procijanidin B1*	120	5	+	579	427	nd	42.03 ± 1.73
12	Procijanidin B2*	120	5	+	579	427	0.17 ± 0.01	3.15 ± 0.09
13	Katehin*	100	5, 10	+	291	165, 139	7.05 ± 0.15	75.78 ± 2.19
14	Epikatehin*	100	10	+	291	139, 123	13.14 ± 0.54	52.25 ± 1.51

<b>Flavonoli</b>								
15	Kamferol ramnozid heksozid	120	15	+	595	287	82.84 ± 4.51	124.07 ± 4.50
16	Kvercetin pentozil heksozid	100	15	+	597	303	57.59 ± 2.75	115.21 ± 3.33
17	Kvercetin-3-rutinozid*	120	5	+	611	303	194.42 ± 2.72	475.31 ± 22.73
18	Kvercetin-3-glukozid*	100	5	+	465	303	nd	96.00 ± 3.31
19	Kvercetin pentozid	100	5	+	435	303	nd	517.91 ± 21.33
20	Kamferol-3- rutinozid*	120	15	+	595	287	5.89 ± 0.08	48.54 ± 2.32
21	Kamferol pentozil heksozid	120	15	+	581	287	81.96 ± 1.77	158.09 ± 5.73
22	Kamferol- 3-heksozid	100	5	+	449	287	13.06 ± 0.54	57.35 ± 1.98
23	Izoramnetin-3- rutinozid	120	15	+	625	317	9.73 ± 0.47	21.69 ± 0.75
24	Kamferol pentozid	120	5	+	419	287	599.05 ± 12.90	1140.34 ± 16.29
25	Kvercetin ramnozid	100	5	+	449	303	223.57 ± 10.69	327.22 ± 17.80
26	Kamferol ramnozid	120	5	+	433	287	0.69 ± 0.01	30.77 ± 0.89
27	Kvercetin acetil heksozid	100	15	+	507	303	0.91 ± 0.01	3.09 ± 0.04
28	Kamferol acetil heksozid	120	5	+	491	287	nd	9.95 ± 0.14
29	Miricetin*	140	25	+	319	273	nd	0.59 ± 0.02
<b>Flavoni</b>								
30	Luteolin*	140	35	+	287	153	2.25 ± 0.09	12.83 ± 0.37

\*Identifikacija je potvrđena upotrebom standarda. nd – nije detektirano. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

U PECT proizvedenim prema eksperimentalnom dizajnu (Tablica 1) identificirano je 30 fenolnih spojeva UPLC-MS/MS (Tablica 10) od čega 10 fenolnih kiselina i 20 flavonoida odnosno jedna hidroksibenzojeva kiselina, devet hidroksicimetnih kiselina, petnaest flavonola, četiri flavanola, i jedan flavon. Među flavonolima najveće koncentracije utvrđene za kamferol pentozid i kvercetin-3-rutinozid. Najveće koncentracije hidroksicimetnih kiselina utvrđene su za kafeinsku kiselinu i 3-*p*-kumaroilkinu kiselinu. Katehin i epikatehin su dominantni u skupini flavanola, dok je u skupini flavona identificiran samo luteolin. U skupini hidroksibenzojevih kiselina identificirana je samo galna kiselina.

#### 4.4. Rezultati određivanja ukupnih hidroksibenzojevih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

U ovom poglavlju opisan je sadržaj ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa (Tablica 11). Kao jedini predstavnik hidroksibenzojevih kiselina identificirana je galna kiselina (Tablica 10).

**Tablica 11.** Koncentracija ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) (mg/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

NOSAČ	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	UHBK (mg/100g s.tv.e.)
MD	0,5	120	2,46 ± 0,03
		150	2,57 ± 0,03
		180	4,35 ± 0,01
	1	120	1,45 ± 0,02
		150	3,14 ± 0,04
		180	3,35 ± 0,03
	2	120	2,37 ± 0,01
		150	2,76 ± 0,03
		180	2,15 ± 0,04
MD + 25% GA	0,5	120	8,05 ± 0,05
		150	8,88 ± 0,03
		180	9,17 ± 0,05
	1	120	8,39 ± 0,04
		150	7,68 ± 0,03
		180	7,10 ± 0,01
	2	120	5,12 ± 0,05
		150	6,17 ± 0,03
		180	6,74 ± 0,04
MD + 50% GA	0,5	120	7,91 ± 0,04
		150	10,43 ± 0,02
		180	9,72 ± 0,03
	1	120	7,22 ± 0,04
		150	7,39 ± 0,05
		180	17,47 ± 0,03
	2	120	4,88 ± 0,05
		150	17,09 ± 0,04
		180	15,89 ± 0,01

MD + 25% IN	0,5	120	10,27 ± 0,04
		150	9,94 ± 0,05
		180	10,37 ± 0,02
	1	120	6,87 ± 0,05
		150	0,97 ± 0,02
		180	0,93 ± 0,02
	2	120	1,25 ± 0,03
		150	1,58 ± 0,04
		180	1,80 ± 0,01
MD + 50% IN	0,5	120	1,48 ± 0,04
		150	0,77 ± 0,01
		180	9,77 ± 0,03
	1	120	6,77 ± 0,02
		150	12,84 ± 0,05
		180	9,55 ± 0,04
	2	120	9,65 ± 0,01
		150	8,25 ± 0,02
		180	11,41 ± 0,03

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UHBK u PECT određen je u rasponu od 0,77-17,47 mg/100g s.tv.e. Najveća koncentracija UHBK određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%GA pri najvećoj temperaturi (180°C) i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 dok je najmanja određena u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%IN pri temperaturi od 150°C te omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Općenito se može uočiti da je koncentracija UHBK bila veća u prahovima proizvedenim pri višoj temperaturi i nižim udjelom nosača osim u prahovima sa MD+50%IN koji pokazuju obrnuti trend.

**Tablica 12.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trine

Parametri inkapsulacije	Hidroksibenzojevih kiselina (mg/100g s.tv.e.)
	<b>UHBK</b>
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p&lt;0,01*</b>
MD	2,73±0,19 <sup>a</sup>
MD+25% GA	7,48±0,31 <sup>bc</sup>
MD+50% GA	10,89±1,08 <sup>c</sup>
MD+25% IN	4,89±1,00 <sup>ab</sup>
MD+50% IN	7,83±0,96 <sup>bc</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv.ekstrakta</b>	<b>p=0,33</b>
0,5	7,08±0,65 <sup>a</sup>
1	6,74±0,81 <sup>a</sup>
2	6,47±0,92 <sup>a</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>p=0,13</b>
120	5,61±0,56 <sup>a</sup>
150	6,70±0,86 <sup>a</sup>
180	7,99±0,88 <sup>a</sup>

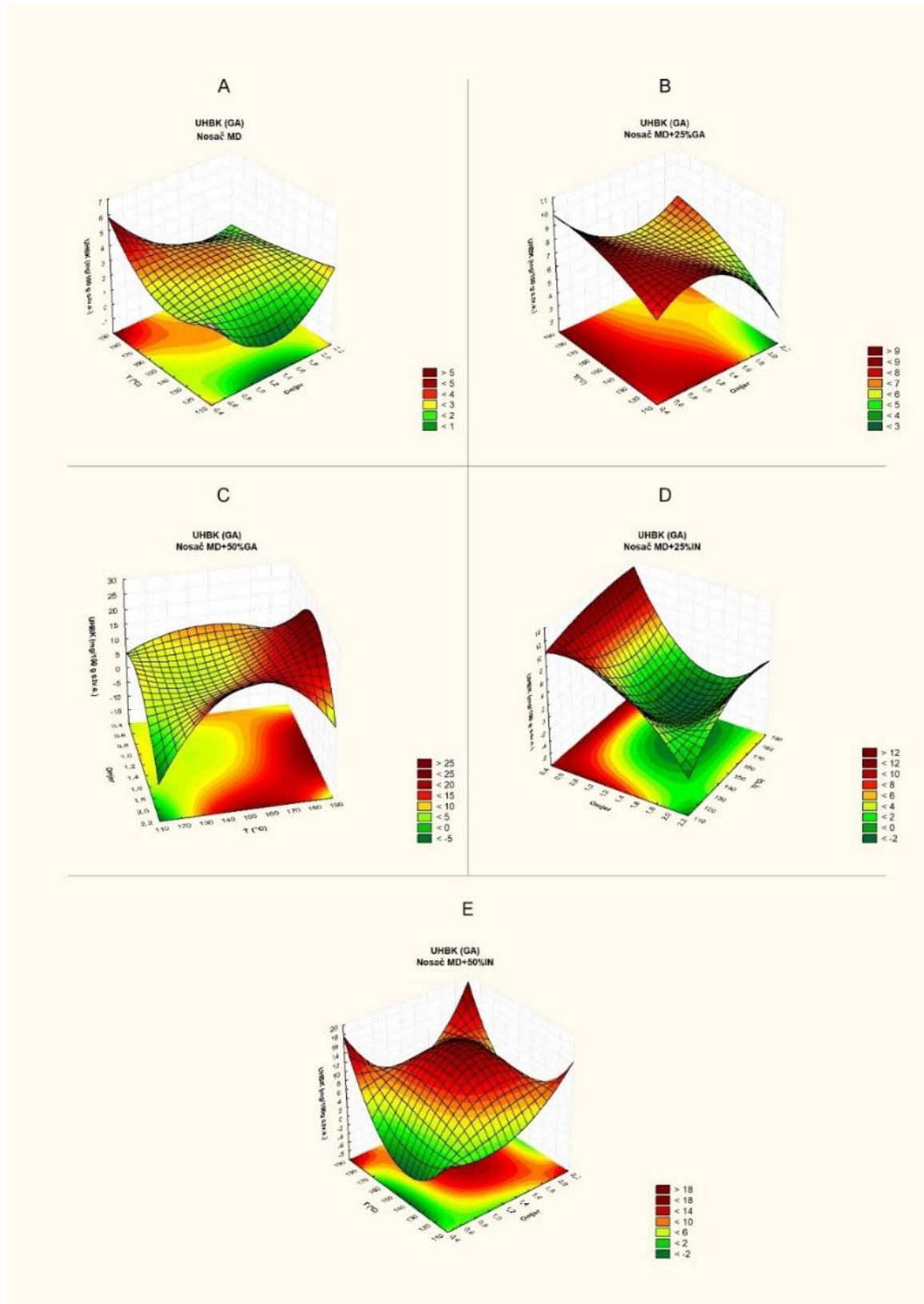
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Tablica 12 prikazuje rezultate statističke analize na temelju koje je utvrđena značajnost utjecaja procesnih parametara (vrste nosača, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja) na koncentraciju UHBK u PECT. Vidljivo je da je na sadržaj UHBK u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trine samo značajno utjecala samo vrsta nosača ( $p \leq 0,05$ ) i to kako slijedi u padajućem nizu: MD+50% GA (10,89 mg/100g s.tv.e.), MD+50% IN (7,83 mg/100g s.tv.e.), MD+25% GA (7,48 mg/100g s.tv.e.), MD+25% IN (4,49 mg/100g s.tv.e.) te MD (2,73 mg/100g s.tv.e.).



#### **4.5. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih hidroksibenzojevih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine**

U skladu sa rezultatima statističke analize trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju UHBK za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja prikazani su na Slici 19. Iz prikaza je vidljivo da svaki tip nosača pokazao drugačije trend zadržavanja UHBK neovisno o omjeru i temperaturi sušenja.



**Slika 18.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

**Tablica 13.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$87,715 - 167,649 X_1 + 59,632 X_1^2 - 1,170 X_2 + 0,004 X_2^2 + 2,236 X_1X_2 - 0,007 X_1X_2^2 - 0,785 X_1^2X_2 + 0,3 X_1^2X_2^2$	0,995	0,990
<b>MD+25% GA</b>	$-28,4385 + 69,8017 X_1 - 28,7732 X_1^2 + 0,4162 X_2 - 0,0010 X_2^2 - 0,7664 X_1X_2 + 0,0019 X_1X_2^2 + 0,3061 X_1^2X_2 - 0,0007 X_1^2X_2^2$	0,971	0,945
<b>MD+50% GA</b>	$-362,616 + 844,273 X_1 - 375,989 X_1^2 + 5,285 X_2 - 0,018 X_2^2 - 12,098 X_1X_2 + 0,042 X_1X_2^2 + 5,333 X_1^2X_2 - 0,018 X_1^2X_2^2$	0,996	0,993
<b>MD+25% IN</b>	$-127,650 + 370,311 X_1 - 153,525 X_1^2 + 1,831X_2 - 0,005 X_2^2 - 4,913 X_1X_2 + 0,015 X_1X_2^2 + 2,005 X_1^2X_2 - 0,006 X_1^2X_2^2$	0,998	0,996
<b>MD+50% IN</b>	$513,00 - 1022,15 X_1 + 398,01 X_1^2 - 7,40 X_2 + 0,03 X_2^2 + 14,68 X_1X_2 - 0,05 X_1X_2^2 - 5,67 X_1^2X_2 + 0,02 X_1^2X_2^2$	0,997	0,995

Koeficijenti determinacije modela (R<sup>2</sup>) i prilagođeni koeficijenti determinacije modela (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za predviđanje vrijednosti koncentracije UHBK u PECT, čije su jednadžbe prikazane u Tablici 13, visoki su za svih pet nosača te iznose kako slijedi: 0,995 (R<sup>2</sup>) i 0,990 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,971 (R<sup>2</sup>) i 0,945 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% GA; 0,996 (R<sup>2</sup>) i 0,993 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% GA; 0,996 (R<sup>2</sup>) i 0,996 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% IN i 0,997 (R<sup>2</sup>) i 0,995 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% IN. Vrijednosti koeficijenata R<sup>2</sup> su iznad 0,8 što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija.

**Tablica 14.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	2	180	4,35	0,985
<b>MD+25% GA</b>	1,75	180	9,17	1,000
<b>MD+50% GA</b>	1,75	180	18,42	1,000
<b>MD+25% IN</b>	2	180	10,37	0,980
<b>MD+50% IN</b>	1,75	160	14,82	1,000

Stupanj poželjnosti UHBK u PECT (Tablica 14) varirao je od 0,985 do 1,000; pri čemu se može uočiti da se maksimalna koncentracija UHBK može postići optimizacijom udjela nosača i temperature sušenja za mješavine MD s arapskom gumom te MD+50% IN. Iz predviđenih vrijednosti koncentracije UHBK je vidljivo da se primjenom MD+50%GA ostvaruje najveće zadržavanje UHBK, dok je najmanje ostvareno uz čisti MD kao nosač.

#### 4.6. Rezultati određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

**Tablica 15.** Koncentracija pojedinačnih i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) (mg/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	3- <i>p</i> -kumaroilikina kiselina	Klorogenska kiselina	3- <i>O</i> -feruloilikina kiselina	3- <i>O</i> -kafeoilikina kiselina	Kafeinska kiselina	4- <i>O</i> -kafeoilikina kiselina	4- <i>p</i> -kumaroilikina kiselina	5- <i>p</i> -kumaroilikina kiselina	Ferulinska kiselina	UHCK
MD	0,5	120	236,70 ± 6,56	54,96 ± 1,52	150,37 ± 4,17	124,40 ± 3,45	565,89 ± 15,69	nd	128,76 ± 3,57	32,84 ± 0,91	10,02 ± 0,28	1303,95 ± 36,16
		150	223,30 ± 7,70	58,99 ± 2,03	135,54 ± 4,68	131,24 ± 4,53	498,30 ± 17,19	7,52 ± 0,26	116,09 ± 4,00	29,05 ± 1,00	8,30 ± 0,29	1208,33 ± 41,68
		180	238,79 ± 3,41	64,18 ± 0,92	145,54 ± 2,08	142,23 ± 2,03	553,00 ± 7,90	8,62 ± 0,12	126,39 ± 1,81	30,26 ± 0,43	8,87 ± 0,13	1317,87 ± 18,83
	1	120	194,83 ± 4,20	53,18 ± 1,15	113,51 ± 2,44	117,14 ± 2,52	482,17 ± 10,38	6,51 ± 0,14	94,27 ± 2,03	24,86 ± 0,54	7,57 ± 0,16	1094,02 ± 23,56
		150	254,84 ± 9,24	70,34 ± 2,55	151,05 ± 5,48	148,15 ± 5,37	634,07 ± 22,99	6,45 ± 0,23	128,80 ± 4,67	32,88 ± 1,19	9,82 ± 0,36	1436,42 ± 52,09
		180	254,81 ± 7,35	73,67 ± 2,13	151,14 ± 4,36	158,72 ± 4,58	598,74 ± 17,28	nd	129,48 ± 3,74	31,99 ± 0,92	9,26 ± 0,27	1407,8 ± 40,63
	2	120	255,84 ± 3,65	67,59 ± 0,97	144,46 ± 2,06	145,84 ± 2,08	694,96 ± 9,93	7,01 ± 0,10	120,53 ± 1,72	33,58 ± 0,48	11,03 ± 0,16	1480,84 ± 21,15
		150	276,40 ± 7,98	73,04 ± 2,11	152,14 ± 4,39	161,70 ± 4,67	663,29 ± 19,14	8,67 ± 0,25	129,62 ± 3,74	34,47 ± 0,99	10,93 ± 0,32	1510,25 ± 43,59
		180	238,99 ± 9,84	63,75 ± 2,63	130,39 ± 5,37	140,16 ± 5,77	593,28 ± 24,44	7,74 ± 0,32	111,04 ± 4,57	29,81 ± 1,23	9,64 ± 0,40	1324,82 ± 54,57
MD + 25% GA	0,5	120	232,03 ± 11,10	66,77 ± 3,19	141,86 ± 6,78	141,12 ± 6,75	572,91 ± 27,40	6,19 ± 0,30	119,14 ± 5,70	31,26 ± 1,50	8,85 ± 0,42	1320,13 ± 63,13
		150	237,55 ± 8,19	67,38 ± 2,32	146,24 ± 5,04	145,46 ± 5,02	591,04 ± 20,39	6,71 ± 0,23	123,02 ± 4,24	33,03 ± 1,14	9,01 ± 0,31	1359,44 ± 46,89
		180	249,45 ± 13,57	67,01 ± 3,64	157,09 ± 8,54	144,87 ± 7,88	647,22 ± 35,20	7,52 ± 0,41	132,22 ± 7,19	36,69 ± 2,00	10,02 ± 0,55	1452,09 ± 78,98
	1	120	254,51 ± 11,13	72,59 ± 3,17	150,98 ± 6,60	153,95 ± 6,73	637,32 ± 27,88	6,39 ± 0,28	125,86 ± 5,51	34,59 ± 1,51	10,04 ± 0,44	1446,22 ± 63,26
		150	257,33 ± 7,43	73,33 ± 2,12	151,98 ± 4,38	150,13 ± 4,33	668,52 ± 19,29	5,95 ± 0,17	127,85 ± 3,69	35,66 ± 1,03	9,81 ± 0,28	1480,51 ± 42,73
		180	249,11 ± 3,56	71,17 ± 1,02	148,66 ± 2,12	150,35 ± 2,15	633,71 ± 9,05	6,45 ± 0,09	124,62 ± 1,78	33,81 ± 0,48	9,81 ± 0,14	1427,67 ± 20,39
	2	120	237,47 ± 11,36	58,03 ± 2,78	136,66 ± 6,54	126,39 ± 6,04	682,62 ± 32,65	7,30 ± 0,35	110,78 ± 5,30	38,36 ± 1,83	12,04 ± 0,58	1409,64 ± 67,41
		150	262,06 ± 7,27	68,95 ± 1,91	149,14 ± 4,14	145,13 ± 4,02	762,87 ± 21,15	6,63 ± 0,18	122,78 ± 3,40	38,08 ± 1,06	11,80 ± 0,33	1567,43 ± 43,46
		180	271,10 ± 9,83	71,38 ± 2,59	151,33 ± 5,49	150,12 ± 5,44	703,63 ± 25,51	7,25 ± 0,26	125,93 ± 4,57	38,72 ± 1,40	11,76 ± 0,43	1531,21 ± 55,52

MD + 50% GA	0,5	120	222,70 ± 9,17	60,56 ± 2,49	135,29 ± 5,57	128,11 ± 5,28	576,69 ± 23,75	6,08 ± 0,25	111,86 ± 4,61	31,43 ± 1,29	8,70 ± 0,36	1281,43 ± 52,78
		150	217,36 ± 4,68	53,51 ± 1,15	134,27 ± 2,89	111,30 ± 2,40	611,34 ± 13,17	4,76 ± 0,10	109,70 ± 2,36	35,24 ± 0,76	10,18 ± 0,22	1287,68 ± 27,73
		180	213,99 ± 7,38	53,98 ± 1,86	132,09 ± 4,56	111,44 ± 3,84	589,35 ± 20,33	4,68 ± 0,16	105,78 ± 3,65	33,95 ± 1,17	9,53 ± 0,33	1254,79 ± 43,28
	1	120	216,22 ± 9,46	53,41 ± 2,34	128,97 ± 0,04	114,71 ± 5,02	607,87 ± 26,59	5,76 ± 0,25	103,00 ± 4,51	34,21 ± 1,50	10,52 ± 0,46	1274,67 ± 55,75
		150	192,01 ± 10,44	46,99 ± 2,56	111,71 ± 0,05	102,45 ± 5,57	565,00 ± 30,73	5,18 ± 0,28	88,38 ± 4,81	30,79 ± 1,67	9,34 ± 0,51	1151,86 ± 62,65
		180	181,61 ± 5,24	32,80 ± 0,95	130,25 ± 0,03	114,99 ± 3,32	430,56 ± 12,43	nd	95,92 ± 2,77	36,14 ± 1,04	11,16 ± 0,32	1033,43 ± 29,83
	2	120	195,83 ± 9,37	45,56 ± 2,18	110,31 ± 5,28	100,06 ± 4,79	628,09 ± 30,04	5,75 ± 0,27	88,70 ± 4,24	32,75 ± 1,57	10,44 ± 0,50	1217,48 ± 58,22
		150	219,92 ± 7,97	34,15 ± 1,24	156,49 ± 5,67	128,70 ± 4,67	483,52 ± 17,53	nd	107,83 ± 3,91	44,03 ± 1,60	13,51 ± 0,49	1188,13 ± 43,08
		180	195,87 ± 2,74	30,69 ± 0,43	138,28 ± 1,94	110,29 ± 1,54	447,07 ± 6,26	nd	91,67 ± 1,28	39,87 ± 0,56	12,44 ± 0,17	1066,19 ± 14,93
MD + 25% IN	0,5	120	213,87 ± 8,81	36,14 ± 1,49	140,80 ± 5,80	91,14 ± 3,75	383,89 ± 15,81	nd	108,15 ± 4,45	33,94 ± 1,40	10,88 ± 0,45	1018,8 ± 41,97
		150	215,38 ± 10,30	32,43 ± 1,55	139,33 ± 6,66	103,04 ± 4,93	222,90 ± 10,66	126,25 ± 6,04	112,93 ± 5,40	32,38 ± 1,55	10,59 ± 0,51	995,25 ± 47,60
		180	216,98 ± 4,53	32,71 ± 0,68	142,04 ± 2,97	100,92 ± 2,11	245,41 ± 5,13	125,78 ± 2,63	113,96 ± 2,38	34,35 ± 0,72	10,90 ± 0,23	1023,06 ± 21,38
	1	120	190,73 ± 10,37	22,08 ± 1,20	122,41 ± 6,66	75,54 ± 4,11	167,99 ± 9,14	118,49 ± 6,44	92,33 ± 5,02	32,10 ± 1,75	11,42 ± 0,62	833,09 ± 45,31
		150	101,79 ± 2,19	15,95 ± 0,34	61,98 ± 1,33	53,31 ± 1,15	160,54 ± 3,46	34,64 ± 0,75	45,24 ± 0,97	14,95 ± 0,32	4,92 ± 0,11	493,32 ± 10,62
		180	96,01 ± 2,01	16,30 ± 0,34	61,90 ± 1,29	53,76 ± 1,12	163,26 ± 3,41	34,64 ± 0,72	45,34 ± 0,95	15,18 ± 0,32	4,83 ± 0,10	491,22 ± 10,27
	2	120	98,27 ± 3,39	15,00 ± 0,52	58,31 ± 2,01	51,19 ± 1,77	179,56 ± 6,19	32,68 ± 1,13	42,59 ± 1,47	15,78 ± 0,54	5,13 ± 0,18	498,52 ± 17,20
		150	112,20 ± 4,07	17,82 ± 0,65	66,37 ± 2,41	60,04 ± 2,18	197,90 ± 7,18	36,99 ± 1,34	48,82 ± 1,77	16,84 ± 0,61	5,54 ± 0,20	562,51 ± 20,40
		180	120,12 ± 1,68	19,42 ± 0,27	71,70 ± 1,00	64,51 ± 0,90	210,66 ± 2,95	39,65 ± 0,56	53,19 ± 0,74	19,44 ± 0,27	6,02 ± 0,08	604,73 ± 8,47
MD + 50% IN	0,5	120	73,55 ± 3,03	14,98 ± 0,62	39,16 ± 1,61	nd	181,13 ± 7,46	0,27 ± 0,01	1,23 ± 0,05	12,96 ± 0,53	3,87 ± 0,16	327,16 ± 13,48
		150	87,53 ± 1,25	11,76 ± 0,17	51,42 ± 0,73	43,18 ± 0,62	140,27 ± 2,00	31,86 ± 0,46	39,76 ± 0,57	13,87 ± 0,20	4,35 ± 0,06	424,00 ± 6,06
		180	178,63 ± 4,95	23,09 ± 0,64	121,81 ± 3,38	71,15 ± 1,97	209,31 ± 5,80	103,95 ± 2,88	90,22 ± 2,50	32,52 ± 0,90	10,37 ± 0,29	841,06 ± 23,32
	1	120	171,79 ± 3,70	20,87 ± 0,45	112,92 ± 2,43	71,25 ± 1,53	161,03 ± 3,47	105,02 ± 2,26	81,57 ± 1,76	29,55 ± 0,64	9,91 ± 0,21	763,91 ± 16,45
		150	204,90 ± 10,51	31,80 ± 1,63	135,04 ± 6,93	131,36 ± 6,74	208,30 ± 10,68	116,93 ± 6,00	99,87 ± 5,12	31,73 ± 1,63	10,62 ± 0,54	970,54 ± 49,78
		180	190,58 ± 6,91	26,54 ± 0,96	127,87 ± 4,64	117,53 ± 4,26	234,30 ± 8,50	112,59 ± 4,08	94,42 ± 3,42	33,68 ± 1,22	11,01 ± 0,40	948,52 ± 34,39
	2	120	233,95 ± 3,34	27,26 ± 0,39	150,62 ± 2,15	99,80 ± 1,43	234,14 ± 3,34	147,82 ± 2,11	111,75 ± 1,60	40,62 ± 0,58	13,09 ± 0,19	1059,04 ± 15,13
		150	217,34 ± 4,54	24,92 ± 0,52	137,50 ± 2,87	97,38 ± 2,04	228,24 ± 4,77	140,60 ± 2,94	102,29 ± 2,14	36,48 ± 0,76	12,39 ± 0,26	997,15 ± 20,84
		180	267,40 ± 7,42	31,21 ± 0,87	172,06 ± 4,77	167,13 ± 4,63	251,45 ± 6,97	175,42 ± 4,86	130,27 ± 3,61	43,90 ± 1,22	14,35 ± 0,40	1253,22 ± 34,75

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

U ovom poglavlju opisan je sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim prema planu pokusa primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature (Tablica 15). U svim proizvedenim PECT identificirano je devet fenolnih kiselina od kojih je najzastupljenija kafeinska kiselina, te u padajućem nizu 3-*p*-kumaroilkina, 3-*O*-feruloilkina, 3-*O*-kafeoilkina, 4-*p*-kumaroilkina, 4-*O*-kafeoilkina, klorogenska, 5-*p*-kumaroilkina te ferulinska kiselina. U prahu dobivenom primjenom nosača MD+50%IN, uz omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5 te temepraturi sušenja od 120°C koncentracija 3-*O*-kafeoilkina kiseline su bile ispod nivoa detekcije (engl. *not detected – nd*). Također su koncentracije 4-*O*-kafeoilkina kiseline bile ispod nivoa detekcije u prahovima dobivenim primjenom: MD pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5 te minimalne temperature sušenja i pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te maksimalne temperature sušenja; MD+50%GA pri temperaturi od 150°C za omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 1, odnosno većoj od 150°C za omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 2; MD+25%IN pri minimalno omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UHCK u PECT određen je u rasponu od 327,16-1567,43 mg/100g s.tv.e. (Tablica 15). Najveća koncentracija UHCK određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%GA pri temperaturi od 180°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 2:1, dok je najmanja koncentracija UHCK određena u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%IN pri temperaturi od 120°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Općenito se može uočiti da je koncentracija UHBK bila veća u prahovima proizvedenim pri višoj temperaturi, dok omjer nosača i suhe tvari ekstrakta varira ovisno o vrsti nosača.

**Tablica 16.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

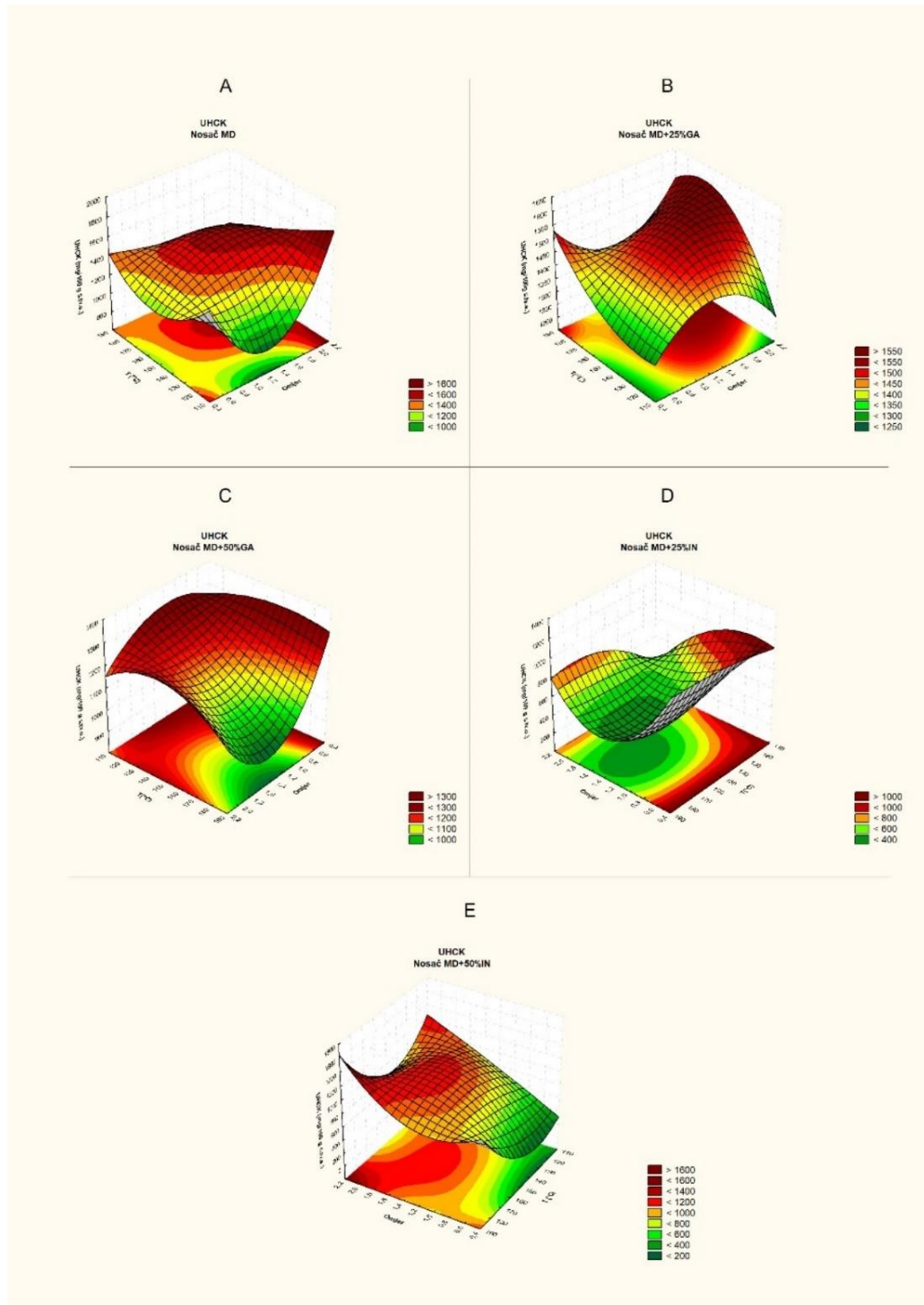
Parametri inkapsulacije	Hidroksicimetne kiseline (mg/100g s.tv.e.)									
	3- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	Klorogenska kiselina	3- <i>O</i> -feruloilkina kiselina	3- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina	Kafeinska kiselina	4- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina	4- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	5- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	Ferulinska kiselina	UHCK
Vrsta nosača	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p=0,06	p<0,01*
MD	241,61±5,45 <sup>b</sup>	64,41±1,75 <sup>bc</sup>	141,57±3,05 <sup>bc</sup>	141,07±3,46 <sup>b</sup>	587,08±16,49 <sup>b</sup>	5,84±0,78 <sup>a</sup>	120,55±2,79 <sup>b</sup>	31,08±0,69 <sup>ab</sup>	9,49±0,29 <sup>a</sup>	1342,70±31,24 <sup>bc</sup>
MD+25% GA	250,07±3,36 <sup>b</sup>	68,51±1,15 <sup>c</sup>	148,21±1,70 <sup>c</sup>	145,28±2,08 <sup>b</sup>	655,54±13,89 <sup>b</sup>	6,71±0,13 <sup>a</sup>	123,58±1,61 <sup>b</sup>	35,58±0,64 <sup>c</sup>	10,35±0,26 <sup>a</sup>	1443,82±20,18 <sup>c</sup>
MD+50% GA	206,17±3,65 <sup>a</sup>	45,74±2,49 <sup>b</sup>	130,85±3,28 <sup>ab</sup>	113,56±2,36 <sup>a</sup>	548,83±17,54 <sup>b</sup>	3,58±0,62 <sup>a</sup>	100,31±2,21 <sup>a</sup>	35,38±0,99 <sup>bc</sup>	10,65±0,36 <sup>a</sup>	1195,07±22,94 <sup>b</sup>
MD+25% IN	151,71±12,75 <sup>a</sup>	23,10±1,91 <sup>a</sup>	96,09±8,85 <sup>a</sup>	72,60±4,80 <sup>a</sup>	214,68±16,01 <sup>a</sup>	61,01±11,07 <sup>b</sup>	73,62±7,39 <sup>a</sup>	23,88±2,05 <sup>a</sup>	7,80±0,69 <sup>a</sup>	724,50±55,08 <sup>a</sup>
MD+50% IN	180,63±14,64 <sup>a</sup>	23,60±1,56 <sup>a</sup>	116,49±10,06 <sup>ab</sup>	88,75±11,32 <sup>a</sup>	205,35±8,60 <sup>a</sup>	103,83±12,68 <sup>b</sup>	83,49±9,04 <sup>a</sup>	30,59±2,46 <sup>abc</sup>	10,00±0,83 <sup>a</sup>	842,73±68,47 <sup>a</sup>
Omjer nosača i s.tv.ekstrakta	p=0,20	p=0,86	p=0,38	p=0,88	p=0,67	p=0,21	p=0,45	p<0,01*	p<0,01*	p=0,51
0,5	203,85±9,51 <sup>a</sup>	46,56±3,52 <sup>a</sup>	127,52±6,21 <sup>a</sup>	105,97±7,42 <sup>a</sup>	439,24±33,44 <sup>a</sup>	29,35±8,45 <sup>a</sup>	102,61±6,42 <sup>a</sup>	30,25±1,28 <sup>a</sup>	8,96±0,39 <sup>a</sup>	1094,34±60,46 <sup>a</sup>
1	200,74±9,25 <sup>a</sup>	45,40±4,10 <sup>a</sup>	124,02±5,26 <sup>a</sup>	114,22±6,54 <sup>a</sup>	423,56±38,29 <sup>a</sup>	37,67±8,69 <sup>a</sup>	98,46±4,90 <sup>a</sup>	30,14±1,21 <sup>a</sup>	9,34±0,37 <sup>a</sup>	1083,55±60,43 <sup>a</sup>
2	213,52±10,64 <sup>a</sup>	43,25±3,89 <sup>a</sup>	128,38±6,37 <sup>a</sup>	116,56±6,69 <sup>a</sup>	464,09±40,22 <sup>a</sup>	41,57±10,81 <sup>a</sup>	99,85±5,30 <sup>a</sup>	33,52±1,66 <sup>b</sup>	10,67±0,52 <sup>b</sup>	1151,41±64,16 <sup>a</sup>
Temperatura (°C)	p=0,71	p=0,87	p=0,33	p=0,21	p=0,99	p=0,31	p=0,41	p=0,40	p=0,76	p=0,92
120	201,88±9,55 <sup>a</sup>	44,60±3,63 <sup>a</sup>	122,44±5,98 <sup>a</sup>	102,71±7,30 <sup>a</sup>	450,42±37,56 <sup>a</sup>	30,35±8,91 <sup>a</sup>	96,04±6,11 <sup>a</sup>	30,59±1,35 <sup>a</sup>	9,57±0,45 <sup>a</sup>	1088,59±62,37 <sup>a</sup>
150	205,33±10,64 <sup>a</sup>	45,42±4,05 <sup>a</sup>	125,34±6,43 <sup>a</sup>	114,17±6,75 <sup>a</sup>	442,41±39,86 <sup>a</sup>	35,94±8,84 <sup>a</sup>	100,20±5,59 <sup>a</sup>	30,63±1,57 <sup>a</sup>	9,41±0,48 <sup>a</sup>	1108,86±66,66 <sup>a</sup>
180	210,90±9,30 <sup>a</sup>	45,19±3,87 <sup>a</sup>	132,14±5,34 <sup>a</sup>	119,88±6,36 <sup>a</sup>	434,06±35,02 <sup>a</sup>	42,29±10,32 <sup>a</sup>	104,70±4,87 <sup>a</sup>	32,69±1,32 <sup>a</sup>	10,00±0,42 <sup>a</sup>	1131,84±56,13 <sup>a</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri p<0,05. \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi



Od pojedinačnih parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem samo je vrsta nosača imala signifikantan utjecaj na sve pojedinačne hidroksicimetne kiseline, osim ferulinske, te na ukupne hidroksicimetne kiseline. Na koncentraciju ferulinske kiseline značajan utjecaj je imao samo omjer nosača i suhe tvari ekstrakta. Na koncentraciju 5-*p*-kumaroilnine kiseline osim utjecaja vrste nosača značajan utjecaj je utvrđen i za omjer nosača i suhe tvari ekstrakta (Tablica 16). Najveće zadržavanje navedenih kiselina zabilježeno je u ekstraktima inkapsuliranim s najvećim omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta. Najviša koncentracija UHCK određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%GA.

#### 4.7. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine



**Slika 19.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

U skladu sa rezultatima statističke analize na Slici 20 su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju UHCK za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te temperature sušenja. Iz navedenih prikaza može se zaključiti da je za svaki tip nosača utvrđen različiti trend promjene koncentracija UHCK neovisno o omjeru i temperaturi sušenja.

**Tablica 17.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$17677,7 - 34095,4 X_1 + 12432,0 X_1^2 - 213,6 X_2 + 0,7 X_2^2 + 438,0 X_1X_2 - 1,4 X_1X_2^2 - 157,3 X_1^2X_2 + 0,5 X_1^2X_2^2$	0,954	0,914
<b>MD+25% GA</b>	$3260,71 - 3434,78 X_1 + 611,78 X_1^2 - 34,81 X_2 + 0,14 X_2^2 + 63,47 X_1X_2 - 0,25 X_1X_2^2 - 14,44 X_1^2X_2 + 0,05 X_1^2X_2^2$	0,774	0,573
<b>MD+50% GA</b>	$-1176,66 + 5180,00 X_1 - 2193,61 X_1^2 + 30,02 X_2 - 0,08 X_2^2 - 60,99 X_1X_2 + 0,15 X_1X_2^2 + 26,22 X_1^2X_2 - 0,07 X_1^2X_2^2$	0,883	0,779
<b>MD+25% IN</b>	$-6791,77 + 21312,95 X_1 - 8952,28 X_1^2 + 103,11 X_2 - 0,30 X_2^2 - 281,32 X_1X_2 + 0,84 X_1X_2^2 + 116,23 X_1^2X_2 - 0,35 X_1^2X_2^2$	0,992	0,985
<b>MD+50% IN</b>	$14572,0 - 28799,3 X_1 + 11878,2 X_1^2 - 218,4 X_2 + 0,8 X_2^2 + 434,9 X_1X_2 - 1,5 X_1X_2^2 - 175,3 X_1^2X_2 + 0,6 X_1^2X_2^2$	0,995	0,991

Vrijednosti koeficijenata R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> za nosače MD, MD+25%IN i MD+50%IN su iznad 0,8 što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija te iznose kako slijedi: 0,954 (R<sup>2</sup>) i 0,914 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,992 (R<sup>2</sup>) i 0,985 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25%IN i 0,995 (R<sup>2</sup>) i 0,991 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%IN (Tablica 17). U slučaju PECT s nosačem MD+50%GA vrijednost koeficijenta R<sup>2</sup> je 0,883 je zadovoljavajuća dok je R<sup>2</sup><sub>adj</sub> vrijednost 0,779. Vrijednost koeficijenata R<sup>2</sup> za PECT s nosačem MD+25%GA je ispod 0,8 (0,774) dok je R<sup>2</sup><sub>adj</sub> 0,573, što ukazuje na nezadovoljavajuću prilagodbu modela eksperimentalnim podacima.

**Tablica 18.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	1,5	160	1551,53	1,000
<b>MD+25% GA</b>	2	180	1531,21	1,000
<b>MD+50% GA</b>	0,5	140	1289,95	0,906
<b>MD+25% IN</b>	0,5	180	1023,06	0,955
<b>MD+50% IN</b>	2	180	1253,22	0,974

Stupanj poželjnosti UHCK u PECT (Tablica 18) varirao je od 0,906 do 1,000 ukazujući na visoku mogućnost optimizacije inkapsulacijskih uvjeta. Vidljivo je da je najveće zadržavanje UHCK moguće postići inkapsulacijom ekstrakta cvijeta trnine primjenom nosača MD i MD+25% GA.

#### 4.8. Rezultati određivanja ukupnih flavonola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

**Tablica 19.** Koncentracija pojedinačnim i ukupnih flavonola (mg/100 g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	Kamferol-3- rutinozid	Kvercetin pentozil heksosid	Kvercetin-3- rutinozid	Kvercetin-3-glukozid	Kamferol pentozil heksosid	Izorametin-3- rutinozid	Kvercetin pentozid	Kvercetin ramnozid	Kamferol-3- glukuronid	Kamferol ramnozid	Kamferol ramnozid heksosid	Kamferol pentozid	Kvercetin acetil rutinozid	Kamferol acetil rutinozid	Miricetin	UFLO
MD	0,5	120	26,54 ± 0,74	79,25 ± 2,20	314,35 ± 8,72	49,15 ± 1,36	93,98 ± 2,61	13,84 ± 0,38	374,07 ± 10,37	277,27 ± 7,69	42,50 ± 1,18	0,88 ± 0,02	95,55 ± 2,65	644,69 ± 17,88	3,03 ± 0,08	nd	0,18 ± 0,00	2015,33 ± 55,88
		150	33,21 ± 1,15	87,47 ± 3,02	411,90 ± 14,21	78,02 ± 2,69	88,37 ± 3,05	17,73 ± 0,61	439,92 ± 15,17	290,42 ± 10,02	49,23 ± 1,70	0,85 ± 0,03	95,24 ± 3,29	709,26 ± 24,46	2,91 ± 0,10	9,46 ± 0,33	0,21 ± 0,01	2314,20 ± 79,82
		180	37,46 ± 0,54	90,89 ± 1,30	404,85 ± 5,78	73,45 ± 1,05	92,54 ± 1,32	16,66 ± 0,24	444,66 ± 6,35	303,64 ± 4,34	49,88 ± 0,71	0,97 ± 0,01	94,65 ± 1,35	1140,34 ± 16,29	3,09 ± 0,04	9,95 ± 0,14	0,17 ± 0,00	2763,18 ± 39,47
	1	120	29,61 ± 0,64	68,66 ± 1,48	331,06 ± 7,13	61,93 ± 1,33	81,96 ± 1,77	14,82 ± 0,32	361,83 ± 7,79	240,76 ± 5,19	38,81 ± 0,84	0,69 ± 0,01	84,42 ± 1,82	599,05 ± 12,90	2,35 ± 0,05	7,50 ± 0,16	0,29 ± 0,01	1923,72 ± 41,43
		150	38,86 ± 1,41	90,67 ± 3,29	412,98 ± 14,98	78,67 ± 2,85	100,12 ± 3,63	18,17 ± 0,66	441,93 ± 16,03	305,30 ± 11,07	51,75 ± 1,88	0,90 ± 0,03	102,27 ± 3,71	726,85 ± 26,36	2,98 ± 0,11	9,41 ± 0,34	0,18 ± 0,01	2381,02 ± 86,34
		180	42,98 ± 1,24	94,74 ± 2,73	459,96 ± 13,28	93,23 ± 2,69	98,48 ± 2,84	19,19 ± 0,55	491,68 ± 14,19	323,02 ± 9,32	56,01 ± 1,62	0,90 ± 0,03	103,10 ± 2,98	780,19 ± 22,52	3,07 ± 0,09	nd	0,14 ± 0,00	2566,68 ± 74,07
	2	120	32,47 ± 0,46	78,91 ± 1,13	331,12 ± 4,73	59,57 ± 0,85	107,32 ± 1,53	15,13 ± 0,22	nd	287,04 ± 4,10	42,88 ± 0,61	0,86 ± 0,01	104,54 ± 1,49	718,74 ± 10,27	2,64 ± 0,04	nd	0,29 ± 0,00	1781,52 ± 25,44
		150	32,15 ± 0,93	85,75 ± 2,48	367,24 ± 10,60	nd	106,54 ± 3,07	15,96 ± 0,46	468,54 ± 13,52	308,00 ± 8,89	47,49 ± 1,37	30,77 ± 0,89	108,33 ± 3,13	795,24 ± 22,95	2,75 ± 0,08	nd	0,21 ± 0,01	2368,97 ± 68,38
		180	30,24 ± 1,25	72,28 ± 2,98	317,08 ± 13,06	59,96 ± 2,47	97,18 ± 4,00	14,65 ± 0,60	384,16 ± 15,82	245,94 ± 10,13	41,60 ± 1,71	0,89 ± 0,04	95,72 ± 3,94	671,44 ± 27,66	2,37 ± 0,10	nd	0,41 ± 0,02	2033,93 ± 83,78
MD + 25% GA	0,5	120	48,54 ± 2,32	98,54 ± 4,71	475,31 ± 22,73	95,66 ± 4,57	92,61 ± 4,43	21,58 ± 1,03	475,85 ± 22,76	311,99 ± 14,92	56,01 ± 2,68	0,88 ± 0,04	99,10 ± 4,74	735,74 ± 35,19	2,85 ± 0,14	nd	0,19 ± 0,01	2514,85 ± 120,27
		150	47,18 ± 2,94	100,13 ± 3,45	470,42 ± 16,23	96,00 ± 3,31	94,71 ± 3,27	21,69 ± 0,75	497,33 ± 17,15	323,14 ± 11,15	57,35 ± 1,98	0,85 ± 0,03	101,18 ± 3,49	774,00 ± 26,70	2,99 ± 0,10	nd	0,13 ± 0,00	2587,09 ± 90,54
		180	44,14 ± 2,40	98,10 ± 5,34	425,03 ± 23,12	81,29 ± 4,42	99,14 ± 5,39	19,3 ± 1,05	495,84 ± 26,97	327,22 ± 17,80	54,74 ± 2,98	1,14 ± 0,06	101,14 ± 5,50	783,59 ± 42,62	2,93 ± 0,16	nd	0,10 ± 0,01	2553,70 ± 137,82
	1	120	43,43 ± 1,90	95,59 ± 4,18	432,89 ± 18,93	88,71 ± 3,88	101,80 ± 4,45	19,1 ± 0,84	496,67 ± 21,72	317,93 ± 13,91	53,04 ± 2,32	1,00 ± 0,04	103,02 ± 4,51	786,99 ± 34,42	2,73 ± 0,12	nd	0,36 ± 0,02	2543,26 ± 111,22
		150	38,67 ± 1,12	94,77 ± 2,73	417,01 ± 12,04	85,08 ± 2,46	102,60 ± 2,96	18,62 ± 0,54	493,77 ± 14,25	320,79 ± 9,26	52,72 ± 1,52	0,90 ± 0,03	103,57 ± 2,99	768,86 ± 22,19	2,68 ± 0,08	nd	0,26 ± 0,01	2500,30 ± 72,16
		180	44,89 ± 0,64	93,89 ± 1,34	439,23 ± 6,27	nd	99,56 ± 1,42	19,47 ± 0,28	493,79 ± 7,05	317,60 ± 4,54	54,32 ± 0,78	0,86 ± 0,01	102,33 ± 1,46	780,83 ± 11,15	2,75 ± 0,04	nd	0,15 ± 0,00	2449,68 ± 34,99
	2	120	26,51 ± 1,27	73,54 ± 3,52	270,68 ± 12,95	48,80 ± 2,33	107,49 ± 5,14	13,61 ± 0,65	455,05 ± 21,76	282,26 ± 13,50	38,54 ± 1,84	0,94 ± 0,04	103,20 ± 4,94	755,20 ± 36,12	2,26 ± 0,11	nd	0,30 ± 0,01	2178,38 ± 104,17
		150	32,98 ± 0,91	82,84 ± 2,30	311,38 ± 8,63	59,89 ± 1,66	108,34 ± 3,00	14,77 ± 0,41	503,20 ± 13,95	300,79 ± 8,34	41,99 ± 1,16	0,90 ± 0,03	108,87 ± 3,02	790,61 ± 21,92	2,36 ± 0,07	nd	0,59 ± 0,02	2359,52 ± 65,43
		180	36,97 ± 1,34	85,48 ± 3,10	337,85 ± 12,25	63,96 ± 2,32	108,34 ± 3,93	15,60 ± 0,57	510,19 ± 18,50	306,99 ± 11,13	45,69 ± 1,66	1,28 ± 0,05	107,77 ± 3,91	787,56 ± 28,56	2,41 ± 0,09	7,65 ± 0,28	0,33 ± 0,01	2418,07 ± 87,68

MD + 50% CA	0,5	120	38,74 ± 1,60	83,57 ± 3,78	404,60 ± 16,67	82,42 ± 3,39	91,38 ± 3,76	19,21 ± 0,79	517,91 ± 21,33	292,95 ± 12,07	50,79 ± 2,09	0,92 ± 0,04	94,87 ± 3,91	705,16 ± 29,05	2,47 ± 0,10	nd	0,07 ± 0,01	2385,14 ± 98,58
		150	31,93 ± 0,69	76,87 ± 1,66	294,11 ± 6,33	55,60 ± 1,20	86,26 ± 1,86	13,84 ± 0,30	436,86 ± 9,41	272,39 ± 5,87	41,36 ± 0,89	0,83 ± 0,02	87,02 ± 1,87	680,70 ± 14,66	2,12 ± 0,05	nd	0,24 ± 0,01	2080,15 ± 44,80
		180	31,55 ± 1,09	78,90 ± 2,72	319,49 ± 11,02	62,46 ± 2,15	89,62 ± 3,09	15,69 ± 0,54	459,96 ± 15,87	273,80 ± 9,44	43,50 ± 1,50	0,96 ± 0,03	89,30 ± 3,08	682,04 ± 23,53	2,15 ± 0,07	nd	0,22 ± 0,01	2149,64 ± 74,15
	1	120	29,33 ± 1,28	73,97 ± 3,24	276,30 ± 12,09	52,95 ± 2,32	92,64 ± 4,05	13,39 ± 0,59	422,03 ± 18,46	260,31 ± 11,39	37,10 ± 1,62	0,84 ± 0,04	89,32 ± 3,91	656,63 ± 28,72	1,97 ± 0,09	6,16 ± 0,27	0,29 ± 0,01	2013,25 ± 88,05
		150	26,67 ± 1,45	64,45 ± 3,51	242,08 ± 13,17	45,66 ± 2,48	82,48 ± 4,49	12,25 ± 0,67	379,14 ± 20,62	230,69 ± 12,55	33,16 ± 1,80	0,76 ± 0,04	82,84 ± 4,51	609,83 ± 33,17	1,70 ± 0,09	nd	0,14 ± 0,01	1811,86 ± 98,55
		180	8,16 ± 0,24	115,21 ± 3,33	265,91 ± 7,67	67,24 ± 1,94	137,41 ± 3,97	15,88 ± 0,46	402,10 ± 11,61	255,34 ± 7,37	41,12 ± 1,19	25,64 ± 0,74	110,89 ± 3,20	943,70 ± 27,24	1,12 ± 0,03	4,16 ± 0,12	nd	2393,89 ± 69,09
	2	120	19,82 ± 0,95	57,59 ± 2,75	195,91 ± 9,37	33,68 ± 1,61	84,39 ± 4,04	9,73 ± 0,47	nd	223,57 ± 10,69	30,3 ± 1,45	0,76 ± 0,04	84,76 ± 4,05	611,02 ± 29,22	1,60 ± 0,08	4,83 ± 0,23	0,18 ± 0,01	1358,19 ± 64,95
		150	7,59 ± 0,28	107,92 ± 3,91	239,71 ± 8,69	54,58 ± 1,98	158,09 ± 5,73	14,06 ± 0,51	437,27 ± 15,86	279,77 ± 10,15	39,12 ± 1,42	30,75 ± 1,12	124,07 ± 4,50	987,28 ± 35,80	1,12 ± 0,04	3,74 ± 0,14	nd	2485,07 ± 90,11
		180	5,89 ± 0,08	92,67 ± 1,30	194,42 ± 2,72	43,64 ± 0,61	135,92 ± 1,90	11,61 ± 0,16	375,76 ± 5,26	240,28 ± 3,36	32,81 ± 0,46	27,91 ± 0,39	106,81 ± 1,50	830,62 ± 11,63	0,91 ± 0,01	3,01 ± 0,04	nd	2102,25 ± 29,44
MD + 25% IN	0,5	120	4,71 ± 0,19	60,27 ± 2,48	269,60 ± 11,11	48,43 ± 1,99	93,62 ± 3,86	12,80 ± 0,53	339,85 ± 14,00	197,38 ± 8,13	33,19 ± 1,37	22,84 ± 0,94	85,80 ± 3,53	628,66 ± 25,89	1,67 ± 0,07	5,00 ± 0,21	0,27 ± 0,01	1804,07 ± 74,31
		150	5,44 ± 0,26	70,27 ± 3,36	296,57 ± 14,18	55,88 ± 2,67	100,77 ± 4,82	14,49 ± 0,69	356,83 ± 17,06	208,82 ± 9,99	36,41 ± 1,74	23,86 ± 1,14	88,18 ± 4,22	666,45 ± 31,87	1,77 ± 0,08	5,14 ± 0,25	0,23 ± 0,01	1931,10 ± 92,34
		180	5,37 ± 0,11	82,85 ± 1,73	295,44 ± 6,17	56,72 ± 1,19	107,68 ± 2,25	14,43 ± 0,30	365,39 ± 7,64	220,41 ± 4,61	37,36 ± 0,78	23,82 ± 0,50	88,70 ± 1,85	747,83 ± 15,63	1,82 ± 0,04	5,48 ± 0,11	0,34 ± 0,01	2053,63 ± 42,92
	1	120	3,21 ± 0,17	31,92 ± 1,74	188,51 ± 10,25	30,69 ± 1,67	56,99 ± 3,10	8,69 ± 0,47	276,68 ± 15,05	126,98 ± 6,91	23,54 ± 1,28	22,13 ± 1,20	68,38 ± 3,72	361,11 ± 19,64	1,19 ± 0,06	2,64 ± 0,14	0,35 ± 0,02	1203,01 ± 65,44
		150	2,76 ± 0,06	40,38 ± 0,87	147,85 ± 3,18	21,40 ± 0,46	62,59 ± 1,35	6,89 ± 0,15	213,05 ± 4,59	114,89 ± 2,47	17,83 ± 0,38	15,94 ± 0,34	49,49 ± 1,07	89,17 ± 9,18	1,20 ± 0,03	4,02 ± 0,09	nd	760,26 ± 24,22
		180	2,60 ± 0,05	40,14 ± 0,84	148,96 ± 3,11	21,13 ± 0,44	61,78 ± 1,29	6,61 ± 0,14	208,66 ± 4,43	117,65 ± 2,46	18,13 ± 0,38	16,32 ± 0,34	49,36 ± 1,03	423,04 ± 8,84	1,22 ± 0,03	3,97 ± 0,08	nd	1119,56 ± 23,46
	2	120	2,15 ± 0,07	33,80 ± 1,17	141,09 ± 4,87	18,82 ± 0,65	49,45 ± 1,71	6,48 ± 0,22	210,10 ± 7,25	118,08 ± 4,07	17,10 ± 0,59	16,47 ± 0,57	48,15 ± 1,66	320,59 ± 11,06	1,15 ± 0,04	3,66 ± 0,13	nd	987,10 ± 34,05
		150	2,70 ± 0,10	46,70 ± 1,69	168,07 ± 6,09	23,02 ± 0,83	54,72 ± 1,98	7,47 ± 0,27	236,26 ± 8,57	132,42 ± 4,80	19,60 ± 0,71	18,40 ± 0,67	52,66 ± 1,91	333,58 ± 12,10	1,31 ± 0,05	4,27 ± 0,15	nd	1101,20 ± 39,93
		180	2,94 ± 0,04	49,37 ± 0,69	180,33 ± 2,52	25,10 ± 0,35	58,67 ± 0,82	8,30 ± 0,12	253,16 ± 3,54	141,41 ± 1,98	21,45 ± 0,30	19,31 ± 0,27	56,65 ± 0,79	360,35 ± 5,05	1,39 ± 0,02	4,44 ± 0,06	nd	1182,86 ± 16,56
MD + 50% IN	0,5	120	8,49 ± 0,35	31,80 ± 1,31	104,25 ± 4,29	nd	45,05 ± 1,86	4,72 ± 0,19	150,22 ± 6,19	93,81 ± 3,86	13,06 ± 0,54	6,57 ± 0,27	41,81 ± 1,70	256,33 ± 10,56	1,12 ± 0,05	3,55 ± 0,15	nd	760,78 ± 31,34
		150	2,46 ± 0,04	37,29 ± 0,53	126,49 ± 1,81	17,06 ± 0,24	41,57 ± 0,59	5,49 ± 0,08	183,26 ± 2,62	102,23 ± 1,46	15,11 ± 0,22	11,67 ± 0,17	42,25 ± 0,60	382,42 ± 5,46	1,11 ± 0,02	3,73 ± 0,05	nd	972,13 ± 13,89
		180	3,55 ± 0,10	47,17 ± 1,31	185,37 ± 5,14	32,66 ± 0,91	80,38 ± 2,23	9,39 ± 0,26	285,81 ± 7,93	163,91 ± 4,55	25,35 ± 0,70	19,92 ± 0,55	76,83 ± 2,13	515,62 ± 14,30	1,24 ± 0,03	3,68 ± 0,10	0,31 ± 0,01	1451,20 ± 40,24
	1	120	3,13 ± 0,07	40,60 ± 0,87	168,52 ± 3,63	29,67 ± 0,64	75,82 ± 1,63	8,82 ± 0,19	263,46 ± 5,67	139,32 ± 3,00	22,50 ± 0,48	20,15 ± 0,43	71,23 ± 1,53	429,15 ± 9,24	1,02 ± 0,02	2,94 ± 0,06	0,28 ± 0,01	1276,61 ± 27,50
		150	4,31 ± 0,22	52,04 ± 2,67	235,22 ± 12,06	42,52 ± 2,18	89,67 ± 4,60	11,07 ± 0,57	322,01 ± 16,52	177,87 ± 9,12	28,98 ± 1,49	23,22 ± 1,19	83,29 ± 4,27	559,74 ± 28,71	1,22 ± 0,06	3,60 ± 0,18	0,37 ± 0,02	1635,14 ± 83,87
		180	3,93 ± 0,14	56,15 ± 2,04	199,90 ± 7,25	37,38 ± 1,36	89,91 ± 3,26	10,21 ± 0,37	308,75 ± 11,20	178,86 ± 6,49	27,43 ± 0,99	22,31 ± 0,81	79,65 ± 2,89	534,07 ± 19,37	1,17 ± 0,04	3,41 ± 0,12	0,38 ± 0,01	1554,50 ± 56,33
	2	120	4,39 ± 0,06	61,23 ± 0,87	209,45 ± 2,99	38,95 ± 0,56	106,24 ± 1,52	11,26 ± 0,16	363,30 ± 5,19	208,86 ± 2,98	30,86 ± 0,44	28,17 ± 0,40	96,24 ± 1,37	626,19 ± 8,95	1,33 ± 0,02	3,38 ± 0,05	0,39 ± 0,01	1790,24 ± 25,58
		150	3,55 ± 0,07	40,86 ± 0,85	213,25 ± 4,46	36,30 ± 0,76	86,48 ± 1,81	10,20 ± 0,21	320,81 ± 6,70	176,83 ± 3,70	28,05 ± 0,59	26,60 ± 0,56	87,12 ± 1,82	515,08 ± 10,76	1,21 ± 0,03	3,65 ± 0,08	0,26 ± 0,01	1550,24 ± 32,40
		180	4,90 ± 0,14	51,83 ± 1,44	276,05 ± 7,65	47,32 ± 1,31	99,55 ± 2,76	12,43 ± 0,34	400,85 ± 11,12	201,33 ± 5,58	35,09 ± 0,97	31,55 ± 0,87	100,05 ± 2,77	574,78 ± 15,94	1,52 ± 0,04	4,65 ± 0,13	0,34 ± 0,01	1842,24 ± 51,09

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Identificirano je ukupno 15 flavonola, kamferol i kvercetin glikozida, od kojih su najzastupljeniji u padajućem nizu neovisno o uvjetima sušenja: kamferol pentozid, kvercetin pentozid, kvercetin-3-rutinozid (rutin) i kvercetin ramnozid. Ipak je koncentracija kamferol pentozida u nekim prahovima je bila ispod nivoa detekcije.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UFLO u PECT određen je u rasponu od 760,2-2763,01 mg/100g s.tv.e. (Tablica 19). Najveća koncentracija UFLO određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD pri temperaturi od 180°C te omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1, dok je najmanja koncentracija UFLO određena u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%IN pri temperaturi od 150°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1. Općenito se može uočiti da je koncentracija UFLO bila veća u prahovima pri višoj temperaturi, dok omjer nosača i suhe tvari ekstrakta varira ovisno o vrsti nosača.



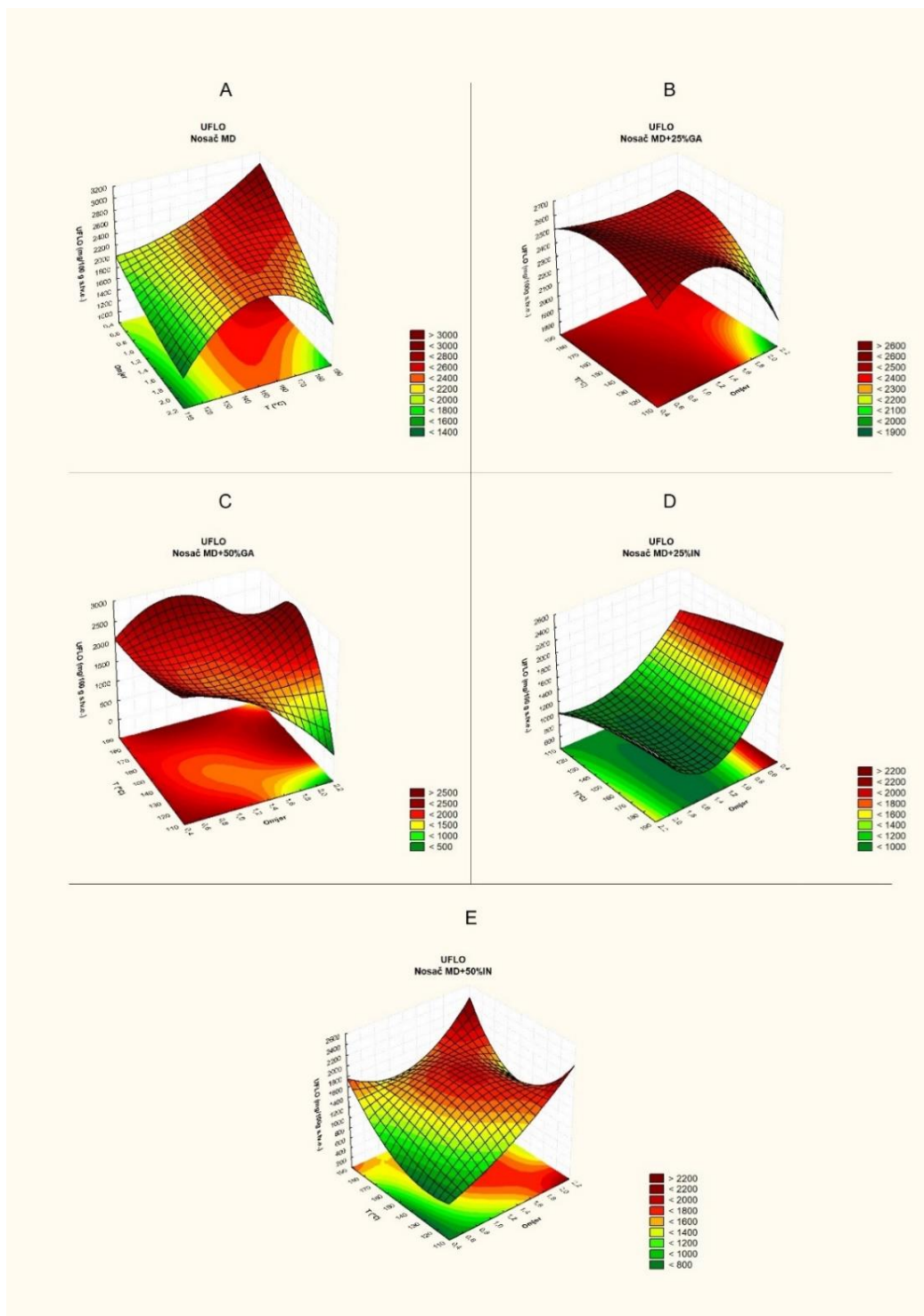
**Tablica 20.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih flavonola (UFLO) (mg/100 g s.tv.e.) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

Parametri inkapsulacije	Flavonoli (mg/100 g s.tv.e.)														
	Kamferol-3-rutinozid	Kvercetin-pentozil heksosid	Kvercetin-3-rutinozid	Kvercetin-3-glukozid	Kamferol-pentozil heksosid	Izoramnetin-3-rutinozid	Kvercetin-pentozil	Kvercetin-ramnozid	Kamferol-3-glukuronid	Kamferol-ramnozid	Kamferol-ramnozil heksosid	Kamferol-pentozid	Kvercetin-acetil rutinozid	Kamferol-acetil rutinozid	UFLO
Vrsta nosača	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
MD	33,72±1,19 <sup>bc</sup>	83,18±2,08 <sup>b</sup>	372,28±12,08 <sup>b</sup>	61,55±6,09 <sup>b</sup>	96,28±1,93 <sup>abc</sup>	16,24±0,42 <sup>bc</sup>	378,53±34,05 <sup>b</sup>	286,82±6,56 <sup>bc</sup>	46,68±1,30 <sup>bc</sup>	4,19±2,28 <sup>a</sup>	98,20±1,70 <sup>b</sup>	753,98±36,19 <sup>b</sup>	2,80±0,07 <sup>b</sup>	4,04±1,11 <sup>b</sup>	2238,49±74,31 <sup>b</sup>
MD+25% GA	40,37±1,68 <sup>a</sup>	91,43±2,13 <sup>b</sup>	397,76±16,90 <sup>b</sup>	68,82±7,03 <sup>b</sup>	101,62±1,48 <sup>bc</sup>	18,20±0,67 <sup>c</sup>	491,30±4,97 <sup>c</sup>	312,08±3,80 <sup>f</sup>	50,49±1,57 <sup>c</sup>	0,97±0,03 <sup>a</sup>	103,35±0,99 <sup>b</sup>	773,71±6,62 <sup>b</sup>	2,66±0,06 <sup>b</sup>	0,85±0,58 <sup>a</sup>	2453,61±32,91 <sup>b</sup>
MD+50% GA	22,19±2,82 <sup>b</sup>	84,37±4,41 <sup>b</sup>	270,28±15,04 <sup>a</sup>	55,36±3,29 <sup>b</sup>	106,47±6,63 <sup>c</sup>	13,96±0,64 <sup>b</sup>	381,23±34,26 <sup>b</sup>	258,79±5,62 <sup>b</sup>	38,81±1,47 <sup>b</sup>	9,93±3,13 <sup>b</sup>	96,66±3,28 <sup>b</sup>	745,22±32,59 <sup>b</sup>	1,68±0,12 <sup>a</sup>	2,43±0,56 <sup>b</sup>	2087,38±80,42 <sup>b</sup>
MD+25% IN	3,54±0,29 <sup>a</sup>	50,63±3,96 <sup>a</sup>	204,05±14,85 <sup>a</sup>	33,47±3,59 <sup>a</sup>	71,81±5,11 <sup>a</sup>	9,57±0,77 <sup>a</sup>	273,68±14,81 <sup>a</sup>	153,12±9,88 <sup>a</sup>	24,96±1,91 <sup>a</sup>	19,90±0,77 <sup>bc</sup>	65,26±4,09 <sup>a</sup>	474,19±37,15 <sup>a</sup>	1,41±0,06 <sup>a</sup>	4,29±0,20 <sup>b</sup>	1389,88±95,03 <sup>a</sup>
MD+50% IN	4,30±0,40 <sup>a</sup>	46,55±2,21 <sup>a</sup>	190,94±12,13 <sup>a</sup>	31,32±3,33 <sup>a</sup>	79,41±5,14 <sup>ab</sup>	9,29±0,60 <sup>a</sup>	288,72±18,43 <sup>a</sup>	160,33±9,33 <sup>a</sup>	25,16±1,65 <sup>a</sup>	21,13±1,81 <sup>c</sup>	75,38±4,80 <sup>a</sup>	488,15±26,16 <sup>a</sup>	1,22±0,03 <sup>a</sup>	3,62±0,11 <sup>ab</sup>	1425,53±83,28 <sup>a</sup>
Omjer nosača i s.tv.ekstrakta	p=0,09	p=0,38	p=0,06	p=0,02	p=0,07	p=0,06	p=0,39	p=0,67	p=0,12	p=0,04	p=0,07	p=0,76	p=0,17	p=0,99	p=0,29
0,5	24,62±3,16 <sup>a</sup>	75,44±3,97 <sup>a</sup>	319,85±20,81 <sup>a</sup>	58,99±4,93 <sup>b</sup>	86,51±3,37 <sup>a</sup>	14,72±0,93 <sup>a</sup>	388,25±20,13 <sup>a</sup>	243,96±13,77 <sup>a</sup>	40,39±2,51 <sup>a</sup>	7,80±1,75 <sup>a</sup>	85,44±3,39 <sup>a</sup>	670,19±35,32 <sup>a</sup>	2,22±0,13 <sup>a</sup>	3,07±0,62 <sup>a</sup>	2021,44±104,34 <sup>a</sup>
1	21,50±3,18 <sup>a</sup>	70,21±4,80 <sup>a</sup>	291,09±20,61 <sup>a</sup>	50,42±5,04 <sup>ab</sup>	88,92±3,66 <sup>a</sup>	13,55±0,85 <sup>a</sup>	371,91±18,43 <sup>a</sup>	228,49±14,80 <sup>a</sup>	37,10±2,49 <sup>a</sup>	10,17±1,90 <sup>ab</sup>	85,54±3,52 <sup>a</sup>	625,75±30,84 <sup>a</sup>	1,89±0,14 <sup>a</sup>	3,19±0,53 <sup>a</sup>	1899,72±99,70 <sup>a</sup>
2	16,35±2,50 <sup>a</sup>	68,05±3,83 <sup>a</sup>	250,24±12,73 <sup>a</sup>	40,91±3,30 <sup>a</sup>	97,92±5,20 <sup>a</sup>	12,08±0,58 <sup>a</sup>	327,91±29,08 <sup>a</sup>	230,24±11,78 <sup>a</sup>	34,17±1,72 <sup>a</sup>	15,70±2,38 <sup>b</sup>	92,33±4,09 <sup>a</sup>	645,22±35,37 <sup>a</sup>	1,76±0,11 <sup>a</sup>	2,89±0,42 <sup>a</sup>	1835,77±90,65 <sup>a</sup>
Temperatura (°C)	p=0,96	p=0,14	p=0,70	p=0,97	p=0,18	p=0,64	p=0,14	p=0,63	p=0,53	p=0,07	p=0,33	p=0,05	p=0,99	p=0,55	p=0,13
120	21,40±2,88 <sup>a</sup>	65,16±4,08 <sup>a</sup>	274,24±19,60 <sup>a</sup>	49,29±4,69 <sup>a</sup>	85,38±3,67 <sup>a</sup>	12,88±0,84 <sup>a</sup>	313,80±29,63 <sup>a</sup>	225,23±13,51 <sup>a</sup>	35,35±2,31 <sup>a</sup>	8,27±1,86 <sup>a</sup>	84,69±3,51 <sup>a</sup>	589,02±30,10 <sup>a</sup>	1,96±0,13 <sup>a</sup>	2,64±0,46 <sup>a</sup>	1769,34±98,92 <sup>a</sup>
150	20,70±3,00 <sup>a</sup>	71,89±4,25 <sup>a</sup>	290,28±19,27 <sup>a</sup>	49,98±4,93 <sup>a</sup>	90,89±4,83 <sup>a</sup>	13,51±0,84 <sup>a</sup>	382,01±19,16 <sup>a</sup>	236,29±14,11 <sup>a</sup>	37,34±2,40 <sup>a</sup>	12,48±2,20 <sup>a</sup>	87,76±4,23 <sup>a</sup>	648,40±32,12 <sup>ab</sup>	1,96±0,14 <sup>a</sup>	3,13±0,58 <sup>a</sup>	1946,64±99,96 <sup>a</sup>
180	20,37±3,21 <sup>a</sup>	76,64±4,07 <sup>a</sup>	296,66±18,41 <sup>a</sup>	51,04±4,46 <sup>a</sup>	97,08±3,89 <sup>a</sup>	13,96±0,73 <sup>a</sup>	392,26±16,94 <sup>a</sup>	241,16±12,41 <sup>a</sup>	38,96±2,20 <sup>a</sup>	12,92±2,16 <sup>a</sup>	90,86±3,30 <sup>a</sup>	703,73±36,32 <sup>b</sup>	1,94±0,14 <sup>a</sup>	3,36±0,54 <sup>a</sup>	2040,95±92,56 <sup>a</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri p≤0,05. \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Na koncentraciju svih pojedinačnih i ukupnih flavonola značajan utjecaj je imala samo vrsta nosača (Tablica 20) dok je na koncentraciju kvercetin-3-heksozida i kamferol ramnozida značajno utjecao i omjer nosača i suhe tvari ekstrakta. Maksimalne koncentracije kvercetin-3-heksozida postignute su kod najmanjeg omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5:1), dok su maksimalne koncentracije kamferol ramnozida postignute kod najvećeg omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (2:1). Na koncentraciju kamferol pentozida također je osim vrste nosača utjecala i temperatura sušenja te su maksimalne vrijednosti određene kod najveće temperatura od 180°C.

#### 4.9. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavonola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine



**Slika 20.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih flavonola (UFLO) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

U skladu sa rezultatima statističke analize na Slici 21 su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju UFLO za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja, iz kojih je vidljivo da je svaki tip nosača pokazao različit trend promjene koncentracija UFLO neovisno o omjeru i temperaturi sušenja. Za čisti MD te mješavine MD i IN je vidljiv pozitivan utjecaj povećanja udjela nosača na koncentraciju UFLO, dok je u slučaju mješavina sa arapskom gumom trend obratan.

**Tablica 21.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih flavonola (UFLO) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$8170,6 - 12604,3 X_1 + 1810,4 X_1^2 - 92,8 X_2 + 0,4 X_2^2 + 172,3 X_1X_2 - 0,6 X_1X_2^2 - 23,4 X_1^2X_2 + 0,1 X_1^2X_2^2$	0,977	0,957
<b>MD+25% GA</b>	$-2614,18 + 9079,84 X_1 - 3827,81 X_1^2 + 65,37 X_2 - 0,20 X_2^2 - 110,78 X_1X_2 + 0,33 X_1X_2^2 + 45,13 X_1^2X_2 - 0,13 X_1^2X_2^2$	0,750	0,527
<b>MD+50% GA</b>	$-7457,3 + 41614,8 X_1 - 23505,3 X_1^2 + 155,5 X_2 - 0,6 X_2^2 - 613,7 X_1X_2 + 2,2 X_1X_2^2 + 344,0 X_1^2X_2 - 1,1 X_1^2X_2^2$	0,973	0,950
<b>MD+25% IN</b>	$-1161,81 + 6201,31 X_1 - 2758,66 X_1^2 + 44,21 X_2 - 0,10 X_2^2 - 98,83 X_1X_2 + 0,24 X_1X_2^2 + 40,53 X_1^2X_2 - 0,10 X_1^2X_2^2$	0,991	0,983
<b>MD+50% IN</b>	$18711,4 - 41217,5 X_1 + 17947,7 X_1^2 - 273,4 X_2 + 1,0 X_2^2 + 609,8 X_1X_2 - 2,1 X_1X_2^2 - 258,5 X_1^2X_2 + 0,9 X_1^2X_2^2$	0,991	0,984

Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za predviđanje koncentracije UFLO za korištene nosače, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja, prikazani su u Tablici 21. Vrijednost koeficijenata R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> za nosače MD, MD+50%GA, MD+25%IN i MD+50%IN su iznad 0,8 što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija te iznose kako slijedi: 0,977 (R<sup>2</sup>) i 0,957 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,973 (R<sup>2</sup>) i 0,950 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%GA; 0,991 (R<sup>2</sup>) i 0,983 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25%IN i 0,991 (R<sup>2</sup>) i 0,984 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%IN. Vrijednost koeficijenata R<sup>2</sup> za PECT s nosačem MD+25%GA je ispod 0,8 (0,750) dok je R<sup>2</sup><sub>adj</sub> 0,527 što ukazuje na nezadovoljavajuću prilagodbu modela eksperimentalnim podacima.

**Tablica 22.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih flavonola (UFLO) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	0,5	180	2763,02	0,973
<b>MD+25% GA</b>	2,0	180	2417,74	1,000
<b>MD+50% GA</b>	2,0	160	2525,23	0,981
<b>MD+25% IN</b>	0,5	180	2053,29	0,973
<b>MD+50% IN</b>	2,0	180	1841,90	0,968

Stupanj poželjnosti UFLO u PECT (Tablica 22) varirao je od 0,968 do 1,000; a najveće zadržavanje UFLO je ostvareno promjenom čistog MD kao nosača u najnižem omjeru (0,5) a pri najvišoj temperaturi sušenja (180°C).

#### 4.10. Rezultati određivanja ukupnih flavanola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

**Tablica 23.** Koncentracija pojedinačnih i ukupnih flavanola (UFLA) (mg/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	Procijanidin B1	Katehin	Procijanidin B2	Epikatehin	UFLA
MD	0,5	120	3,80 ± 0,11	66,64 ± 1,85	0,72 ± 0,02	50,91 ± 1,41	122,06 ± 3,38
		150	19,98 ± 0,69	63,33 ± 2,18	0,74 ± 0,03	47,97 ± 1,65	132,03 ± 4,55
		180	12,93 ± 0,18	65,65 ± 0,94	0,97 ± 0,01	49,53 ± 0,71	129,07 ± 1,48
	1	120	nd	56,64 ± 1,22	0,94 ± 0,02	39,02 ± 0,84	96,60 ± 2,08
		150	19,42 ± 0,70	71,45 ± 2,59	0,77 ± 0,03	51,35 ± 1,86	143,00 ± 5,19
		180	31,46 ± 0,91	71,35 ± 2,06	1,04 ± 0,03	52,25 ± 1,51	156,10 ± 4,51
	2	120	nd	73,26 ± 1,05	1,14 ± 0,02	49,81 ± 0,71	124,21 ± 1,77
		150	16,68 ± 0,48	75,78 ± 2,19	1,51 ± 0,04	53,09 ± 1,53	147,07 ± 4,24
		180	42,03 ± 1,73	65,47 ± 2,70	1,19 ± 0,05	45,02 ± 1,85	153,72 ± 6,33
MD + 25% GA	0,5	120	28,05 ± 1,34	62,53 ± 2,99	0,69 ± 0,03	46,69 ± 2,16	137,97 ± 6,53
		150	28,29 ± 0,98	65,01 ± 2,24	0,82 ± 0,03	47,24 ± 1,63	141,37 ± 4,88
		180	34,98 ± 1,90	70,44 ± 3,83	1,23 ± 0,07	51,18 ± 2,78	157,83 ± 8,58
	1	120	34,58 ± 1,51	70,82 ± 3,10	0,79 ± 0,03	50,06 ± 2,19	156,25 ± 6,83
		150	33,95 ± 0,98	71,78 ± 2,07	0,80 ± 0,02	50,61 ± 1,46	157,13 ± 4,53
		180	45,23 ± 0,65	68,14 ± 0,97	0,67 ± 0,01	48,47 ± 0,69	162,52 ± 2,32
	2	120	nd	68,28 ± 3,27	0,74 ± 0,04	46,22 ± 2,21	115,24 ± 5,51
		150	nd	74,13 ± 2,06	0,70 ± 0,02	49,90 ± 1,38	124,73 ± 3,46
		180	13,42 ± 0,49	74,02 ± 2,68	0,69 ± 0,02	50,53 ± 1,83	138,66 ± 5,03
MD + 50% GA	0,5	120	27,64 ± 1,14	61,24 ± 2,52	0,71 ± 0,03	44,06 ± 1,81	133,66 ± 5,51
		150	nd	62,11 ± 1,34	0,84 ± 0,02	43,94 ± 0,95	106,89 ± 2,30
		180	25,53 ± 0,88	61,89 ± 2,13	0,78 ± 0,03	42,36 ± 1,46	130,55 ± 4,50
	1	120	10,82 ± 0,47	61,19 ± 2,68	0,66 ± 0,03	41,65 ± 1,82	114,32 ± 5,00
		150	9,77 ± 0,53	54,36 ± 2,96	0,37 ± 0,02	36,13 ± 1,97	100,63 ± 5,47
		180	17,96 ± 0,52	20,84 ± 0,60	2,00 ± 0,06	32,19 ± 0,93	72,98 ± 2,11
	2	120	24,67 ± 1,18	55,28 ± 2,64	0,44 ± 0,02	36,88 ± 1,76	117,27 ± 5,61
		150	18,18 ± 0,66	26,13 ± 0,95	1,98 ± 0,07	40,50 ± 1,47	86,78 ± 3,15
		180	15,75 ± 0,22	27,25 ± 0,38	1,76 ± 0,02	35,96 ± 0,50	80,72 ± 1,13

MD + 25% IN	0,5	120	16,27 ± 0,67	18,79 ± 0,77	2,17 ± 0,09	35,64 ± 1,47	72,87 ± 3,00
		150	10,83 ± 0,52	10,03 ± 0,48	2,62 ± 0,13	36,18 ± 1,73	59,66 ± 2,85
		180	13,29 ± 0,28	10,98 ± 0,23	2,86 ± 0,06	37,48 ± 0,78	64,61 ± 1,35
	1	120	11,61 ± 0,63	7,71 ± 0,42	1,93 ± 0,11	32,25 ± 1,75	53,51 ± 2,91
		150	10,67 ± 0,23	20,47 ± 0,44	0,65 ± 0,01	25,35 ± 0,55	57,15 ± 1,23
		180	9,63 ± 0,20	20,20 ± 0,42	0,67 ± 0,01	25,62 ± 0,54	56,12 ± 1,17
	2	120	10,11 ± 0,35	21,55 ± 0,74	0,64 ± 0,02	25,40 ± 0,88	57,71 ± 1,99
		150	13,00 ± 0,47	22,97 ± 0,83	0,94 ± 0,03	27,57 ± 1,00	64,48 ± 2,34
		180	14,23 ± 0,20	26,08 ± 0,37	1,04 ± 0,01	30,36 ± 0,43	71,70 ± 1,00
MD + 50% IN	0,5	120	4,75 ± 0,20	23,04 ± 0,95	0,17 ± 0,01	13,14 ± 0,54	41,10 ± 1,69
		150	8,15 ± 0,12	16,30 ± 0,23	0,78 ± 0,01	23,37 ± 0,33	48,60 ± 0,69
		180	9,05 ± 0,25	8,47 ± 0,23	2,39 ± 0,07	31,63 ± 0,88	51,53 ± 1,43
	1	120	10,05 ± 0,22	7,05 ± 0,15	1,79 ± 0,04	27,95 ± 0,60	46,84 ± 1,01
		150	9,90 ± 0,51	10,36 ± 0,53	2,08 ± 0,11	32,65 ± 1,67	54,98 ± 2,82
		180	8,61 ± 0,31	9,73 ± 0,35	2,22 ± 0,08	32,18 ± 1,17	52,74 ± 1,91
	2	120	18,16 ± 0,26	9,53 ± 0,14	2,57 ± 0,04	38,65 ± 0,55	68,92 ± 0,98
		150	21,66 ± 0,45	8,06 ± 0,17	2,38 ± 0,05	34,73 ± 0,73	66,82 ± 1,40
		180	9,14 ± 0,25	9,83 ± 0,27	3,15 ± 0,09	44,03 ± 1,22	66,15 ± 1,83

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Katehin, epikatehin, procijanidin B1 i procijanidin B2 su identificirani flavanoli u PECT. Udjeli pojedinačnih flavanola su bili isti u svim prahovima bez obzira na uvjete sušenja. Nadalje koncentracija procijanidina B1 je bila ispod nivoa detekcije (*nd*) u prahovima dobivenim primjenom: MD pri temperaturi 120°C te omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1 i 2; MD+25%GA pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 2 te temperaturi sušenja 120 i 150°C; MD+50%GA pri minimalnom omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te temperaturi sušenja od 150°C. U najvećem udjelu zastupljen je katehin, a u padajućem nizu slijede epikatehin, procijanidin B1 i procijanidin B2 neovisno o uvjetima sušenja.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UFLA u PECT određen je u rasponu od 41,10-157,83 mg/100g s.tv.e. (Tablica 23). Najveća koncentracija UFLA određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%GA pri temperaturi od 180°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1, dok je najmanja koncentracija UFLA određena u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%IN pri temperaturi od 120°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Općenito se može uočiti da je koncentracija UFLA bila veća u prahovima pri nižem omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta, izuzev u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%IN koji pokazuju obrnuti trend, dok temperatura varira ovisno o vrsti nosača.



**Tablica 24.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih flavanola (UFLA) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trine

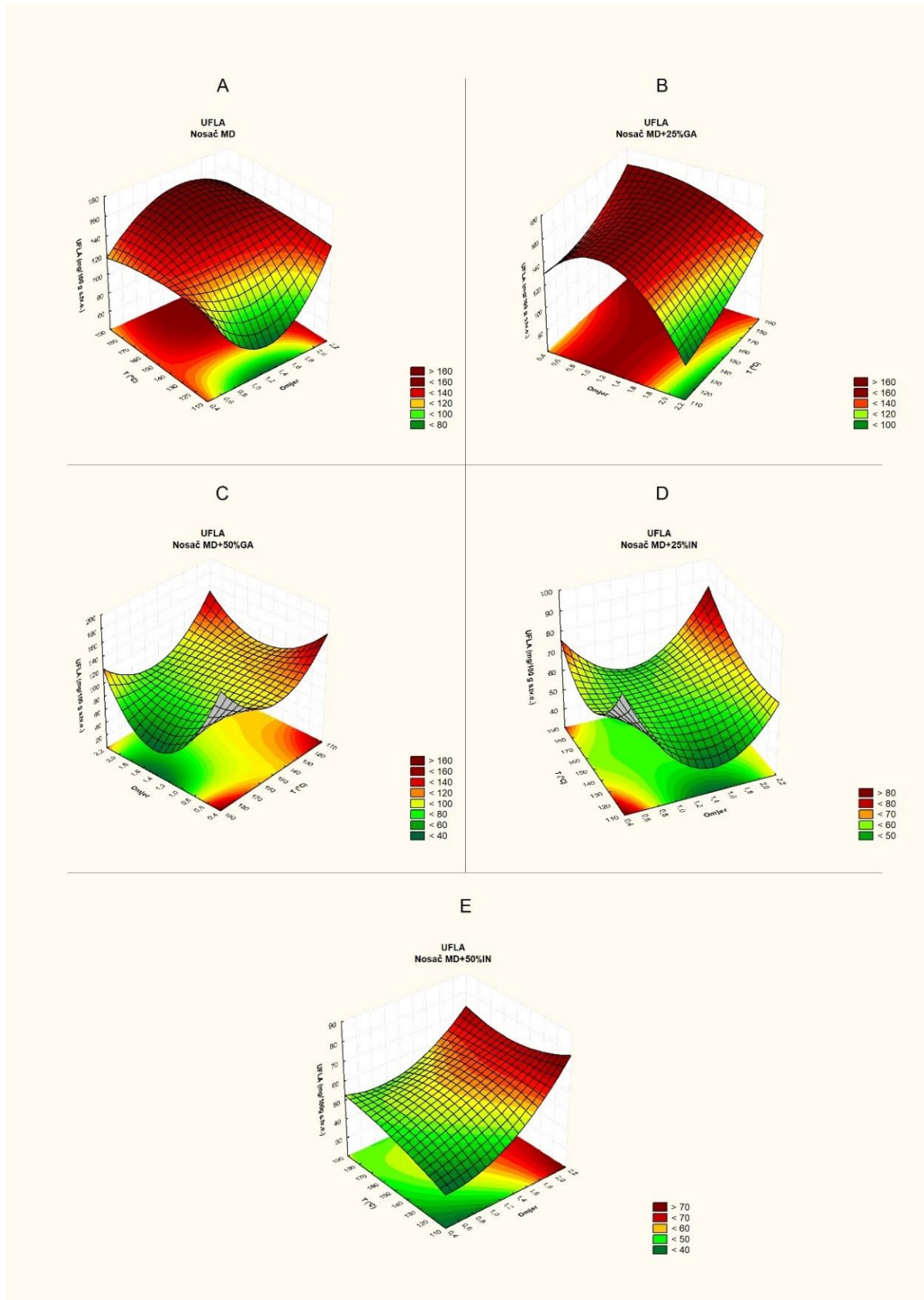
Parametri inkapsulacije	Flavanoli (mg/100g s.tv.e.)				
	Procijanidin B1	Katehin	Procijanidin B2	Epikatehin	UFLA
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p=0,01*</b>	<b>p&lt;0,01*</b>	<b>p&lt;0,01*</b>	<b>p&lt;0,01*</b>	<b>p&lt;0,01*</b>
MD	16,26±3,25 <sup>ab</sup>	67,73±1,38 <sup>cd</sup>	1,00±0,06 <sup>ab</sup>	48,77±1,03 <sup>b</sup>	133,76±4,33 <sup>bc</sup>
MD+25% GA	24,28±3,69 <sup>b</sup>	69,46±1,00 <sup>d</sup>	0,79±0,04 <sup>a</sup>	48,82±0,59 <sup>b</sup>	143,35±3,86 <sup>c</sup>
MD+50% GA	16,70±2,03 <sup>ab</sup>	47,81±4,04 <sup>bc</sup>	1,06±0,15 <sup>a</sup>	39,30±0,98 <sup>a</sup>	104,87±4,96 <sup>b</sup>
MD+25% IN	12,18±0,50 <sup>ab</sup>	17,64±1,48 <sup>ab</sup>	1,50±0,21 <sup>ab</sup>	30,65±1,15 <sup>a</sup>	61,98±1,62 <sup>a</sup>
MD+50% IN	11,05±1,22 <sup>a</sup>	11,37±1,17 <sup>a</sup>	1,95±0,21 <sup>b</sup>	30,93±2,04 <sup>a</sup>	55,30±2,27 <sup>a</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv.ekstrakta</b>	p=0,91	p=0,68	p=0,45	p=0,66	p=0,94
0,5	16,24±1,91 <sup>a</sup>	44,43±4,59 <sup>a</sup>	1,23±0,15 <sup>a</sup>	39,99±1,94 <sup>a</sup>	101,89±7,27 <sup>a</sup>
1	17,58±2,29 <sup>a</sup>	41,47±4,96 <sup>a</sup>	1,16±0,12 <sup>a</sup>	38,52±1,77 <sup>a</sup>	98,72±8,22 <sup>a</sup>
2	14,47±1,94 <sup>a</sup>	42,51±4,88 <sup>a</sup>	1,39±0,15 <sup>a</sup>	40,58±1,58 <sup>a</sup>	98,95±6,07 <sup>a</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	p=0,14	p=0,87	<b>p=0,03*</b>	p=0,85	p=0,63
120	13,37±2,01 <sup>a</sup>	44,24±4,64 <sup>a</sup>	1,07±0,13 <sup>a</sup>	38,45±1,89 <sup>a</sup>	97,13±6,68 <sup>a</sup>
150	14,70±1,68 <sup>a</sup>	43,49±4,88 <sup>a</sup>	1,20±0,13 <sup>ab</sup>	40,04±1,80 <sup>a</sup>	99,42±7,03 <sup>a</sup>
180	20,22±2,24 <sup>a</sup>	40,69±4,90 <sup>a</sup>	1,51±0,15 <sup>b</sup>	40,59±1,60 <sup>a</sup>	103,00±7,93 <sup>a</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri p<0,05. \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

U svim PECT vrsta nosača imala signifikantan utjecaj na sve pojedinačne i ukupne flavanole (Tablica 24). Maksimalne vrijednost koncentracija ukupnih flavanola te procijanidina B1, katehina i epikatehina određene su u PECT s nosačem MD+25%, dok su za procijanidin B2 najveće koncentracije bile prisutne u prahovima s nosačem MD+50%IN. Na koncentraciju procijanidina B2 statistički značajan utjecaj imala je i temperatura sušenja rezultirajući višim koncentracijama pri višim temperaturama sušenja.

#### **4.11. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavanola u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine**

Na Slici 22 prikazan je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentraciju UFLA za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe travi ekstrakta te temperature sušenja. Kod nosača MD+50%IN se uočava pravilan trend porasta koncentracije UFLA s porastom udjela nosača do maksimalne vrijednosti, dok je u slučaju MD+25%GA taj porast izražen do omjera 1,2 nakon čega dolazi do pada koncentracije UFLA.



**Slika 21.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih flavanola (UFLA) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

**Tablica 25.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih flavanola (UFLA) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$675,66 - 1792,67 X_1 + 695,07 X_1^2 - 5,97 X_2 + 0,01 X_2^2 + 20,43 X_1X_2 - 0,05 X_1X_2^2 - 7,93 X_1^2X_2 + 0,02 X_1^2X_2^2$	0,974	0,951
<b>MD+25% GA</b>	$263,5836 - 60,6305 X_1 - 5,1935 X_1^2 - 2,9951 X_2 + 0,0129 X_2^2 + 3,3742 X_1X_2 - 0,0156 X_1X_2^2 - 1,0253 X_1^2X_2 + 0,0052 X_1^2X_2^2$	0,939	0,884
<b>MD+50% GA</b>	$2088,72 - 3315,78 X_1 + 1256,59 X_1^2 - 27,38 X_2 + 0,09 X_2^2 + 46,69 X_1X_2 - 0,16 X_1X_2^2 - 17,67 X_1^2X_2 + 0,06 X_1^2X_2^2$	0,979	0,960
<b>MD+25% IN</b>	$846,84 - 1303,23 X_1 + 448,67 X_1^2 - 10,03 X_2 + 0,03 X_2^2 + 16,61 X_1X_2 - 0,05 X_1X_2^2 - 5,76 X_1^2X_2 + 0,02 X_1^2X_2^2$	0,949	0,904
<b>MD+50% IN</b>	$117,490 - 401,126 X_1 + 194,114 X_1^2 - 1,259 X_2 + 0,005 X_2^2 + 5,688 X_1X_2 - 0,019 X_1X_2^2 - 2,601 X_1^2X_2 + 0,009 X_1^2X_2^2$	0,985	0,971

Vrijednosti koeficijenata R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> UFLA (Tablica 25) za sve nosače su iznad 0,8 što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija te iznose kako slijedi: 0,974 (R<sup>2</sup>) i 0,951 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,939 (R<sup>2</sup>) i 0,884 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% GA; 0,979 (R<sup>2</sup>) i 0,960 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% GA te 0,949 (R<sup>2</sup>) i 0,904 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% IN i 0,985 (R<sup>2</sup>) i 0,971 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% IN (Tablica 25).

**Tablica 26.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih flavanola (UFLA) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	1,75	180	161,37	1,000
<b>MD+25% GA</b>	1,0	180	162,52	0,969
<b>MD+50% GA</b>	0,5	120	133,66	0,941
<b>MD+25% IN</b>	0,5	120	72,87	0,910
<b>MD+50% IN</b>	2	120	68,92	0,977

Stupanj poželjnosti UFLA u PECT (Tablica 26) varirao je od 0,910 do 1,000; a najveće zadržavanje UFLA u inkapsuliranim ekstraktima je ostvareno primjenom nosača MD i MD+25%GA pri 180°C, pri čemu je za optimalnu koncentraciju potreban omjer MD viši (1,75), a mješavine s arapskom gumom niži (1).

#### 4.12. Rezultati određivanja ukupnih flavona u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

U ovom poglavlju opisan je sadržaj ukupnih flavona (UFL) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature (Tablica 27). Iz skupine flavona u identificiran je samo luteolin (Tablica 10).

**Tablica 27.** Koncentracije pojedinačnih i ukupnih flavona (UFL) (mg/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	UFL
MD	0,5	120	10,66 ± 0,30
		150	6,31 ± 0,22
		180	11,72 ± 0,17
	1	120	9,61 ± 0,21
		150	12,13 ± 0,44
		180	12,97 ± 0,37
	2	120	10,67 ± 0,15
		150	12,52 ± 0,36
		180	10,04 ± 0,41
MD + 25% GA	0,5	120	12,01 ± 0,57
		150	12,93 ± 0,45
		180	12,03 ± 0,65
	1	120	12,42 ± 0,54
		150	12,22 ± 0,35
		180	12,12 ± 0,17
	2	120	10,61 ± 0,51
		150	11,95 ± 0,33
		180	10,08 ± 0,37

MD + 50% GA	0,5	120	11,55 ± 0,48
		150	9,72 ± 0,21
		180	10,44 ± 0,36
	1	120	6,18 ± 0,27
		150	8,40 ± 0,46
		180	9,29 ± 0,27
	2	120	7,98 ± 0,38
		150	8,76 ± 0,32
		180	7,33 ± 0,10
MD + 25% IN	0,5	120	5,73 ± 0,24
		150	6,94 ± 0,33
		180	6,26 ± 0,13
	1	120	4,56 ± 0,25
		150	3,05 ± 0,07
		180	3,12 ± 0,07
	2	120	3,06 ± 0,11
		150	3,24 ± 0,12
		180	3,83 ± 0,05
MD + 50% IN	0,5	120	2,25 ± 0,09
		150	2,59 ± 0,04
		180	4,61 ± 0,13
	1	120	4,38 ± 0,09
		150	6,22 ± 0,32
		180	5,94 ± 0,22
	2	120	6,34 ± 0,09
		150	5,27 ± 0,11
		180	6,91 ± 0,19

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UFL u PECT određen je u rasponu od 2,25-12,83 mg/100g s.tv.e. Najveća koncentracija UFL određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD pri najvećoj temperaturi (180°C) i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1. Najmanja koncentracija određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%IN pri temperaturi od 120°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Općenito se može uočiti da je koncentracija UFL bila veća u prahovima pri nižim udjelima nosača, osim u prahovima s MD+50%IN koji pokazuju obrnuti trend, dok temperatura varira ovisno o vrsti nosača.

**Tablica 28.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih flavona (UFL) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trine

Parametri inkapsulacije	Ukupni flavoni (mg/100 g s.tv.e.)
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p&lt;0,01</b>
MD	10,51±0,47 <sup>b</sup>
MD+25% GA	11,55±0,23 <sup>b</sup>
MD+50% GA	8,72±0,38 <sup>b</sup>
MD+25% IN	4,29±0,32 <sup>a</sup>
MD+50% IN	4,69±0,35 <sup>a</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv.ekstrakta</b>	<b>p=0,78</b>
0,5	8,21±0,65 <sup>a</sup>
1	7,96±0,06 <sup>a</sup>
2	7,69±0,54 <sup>a</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>p=0,74</b>
120	7,64±0,61 <sup>a</sup>
150	7,96±0,65 <sup>a</sup>
180	8,25±0,58 <sup>a</sup>

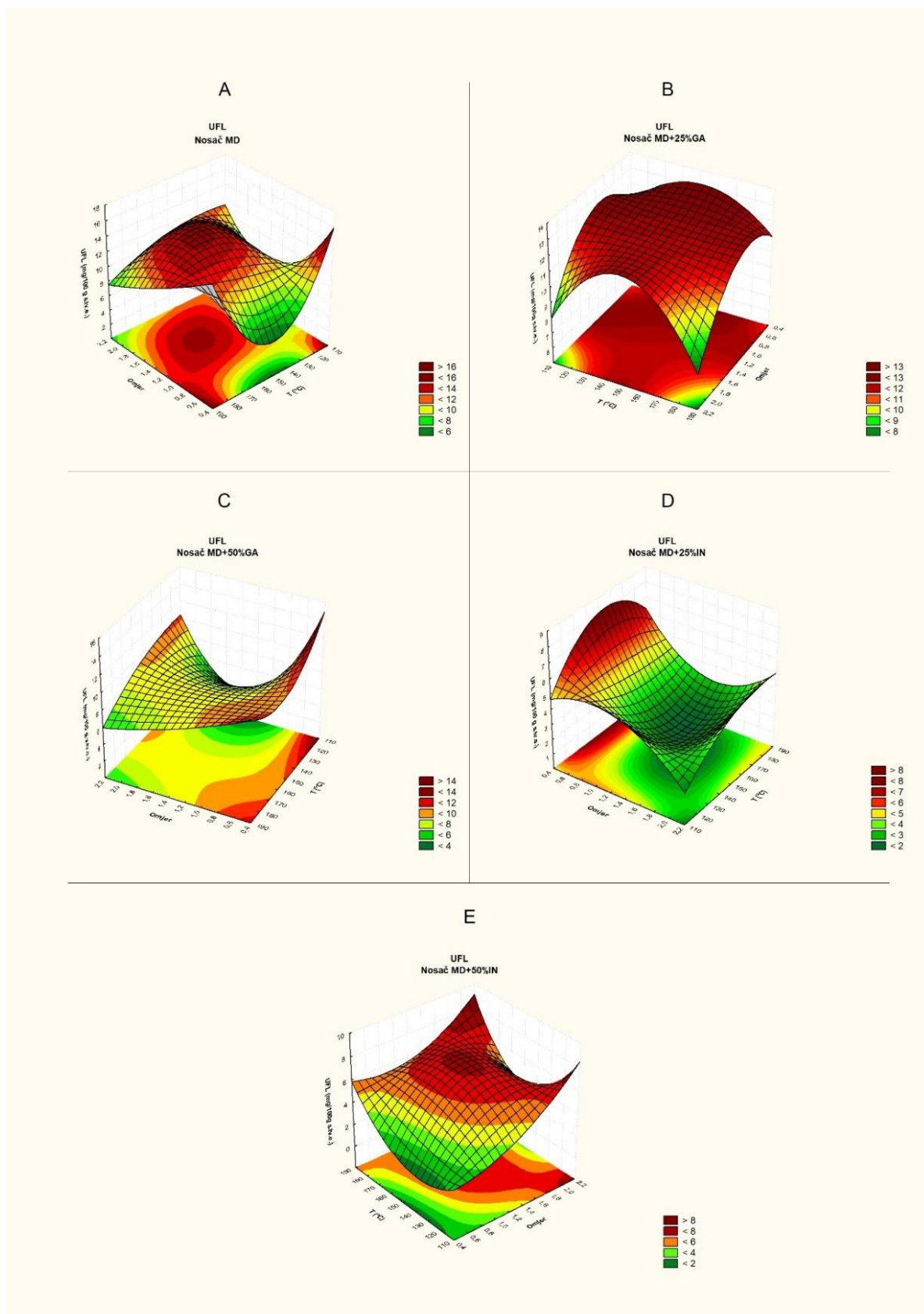
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Statističkom analizom (Tablica 28) pokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih flavona u PECT ( $p \leq 0,05$ ). Minimalne vrijednosti koncentracija pojedinačnih i ukupnih flavona su postignute pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim s MD+25% GA kao nosačem.



#### **4.13. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih flavona u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine**

U skladu sa rezultatima statističke analize na Slici 24 prezentirani su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju UFL za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja, iz kojih je vidljivo da je svaki tip nosača pokazao različit trend promjene koncentracija UFL neovisno o omjeru i temperaturi sušenja.



**Slika 22.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih flavona (UFL) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

**Tablica 29.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih flavona (UFL) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$356,840 - 549,978 X_1 + 175,754 X_1^2 - 4,733 X_2 + 0,016 X_2^2 + 7,418 X_1X_2 - 0,024 X_1X_2^2 - 2,348 X_1^2X_2 + 0,008 X_1^2X_2^2$	0,987	0,975
<b>MD+25% GA</b>	$-64,1820 + 138,3704 X_1 - 59,8877 X_1^2 + 1,0349 X_2 - 0,0034 X_2^2 - 1,8619 X_1X_2 + 0,0061 X_1X_2^2 + 0,8043 X_1^2X_2 - 0,0027 X_1^2X_2^2$	0,871	0,757
<b>MD+50% GA</b>	$144,921 - 241,018 X_1 + 79,957 X_1^2 - 1,615 X_2 + 0,005 X_2^2 + 2,795 X_1X_2 - 0,008 X_1X_2^2 - 0,904 X_1^2X_2 + 0,003 X_1^2X_2^2$	0,977	0,956
<b>MD+25% IN</b>	$-98,7769 + 197,7514 X_1 - 72,6137 X_1^2 + 1,4209 X_2 - 0,0045 X_2^2 - 2,6781 X_1X_2 + 0,0084 X_1X_2^2 + 0,9706 X_1^2X_2 - 0,0030 X_1^2X_2^2$	0,993	0,986
<b>MD+50% IN</b>	$108,406 - 230,065 X_1 + 97,408 X_1^2 - 1,552 X_2 + 0,005 X_2^2 + 3,312 X_1X_2 - 0,011 X_1X_2^2 - 1,379 X_1^2X_2 + 0,005 X_1^2X_2^2$	0,995	0,990

U Tablici 29 su prikazane jednadžbe modela za predviđanje koncentracije UFL pri odabranim nosačima, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja, s pripadajućim R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> koeficijentima. Vrijednosti svih koeficijenata R<sup>2</sup> su iznad 0,8 , što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija. Vrijednosti koeficijenata iznose kako slijedi: 0,987 (R<sup>2</sup>) i 0,975 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,871 (R<sup>2</sup>) i 0,757 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% GA; 0,977 (R<sup>2</sup>) i 0,956 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) MD+50% GA; 0,993 (R<sup>2</sup>) i 0,986 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25% GA te 0,995 (R<sup>2</sup>) i 0,990 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50% GA.

**Tablica 30.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih flavona (UFL) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	1,5	170	13,72	1,000
<b>MD+25% GA</b>	2,0	180	10,08	0,969
<b>MD+50% GA</b>	0,5	120	11,55	0,943
<b>MD+25% IN</b>	0,5	150	6,94	0,944
<b>MD+50% IN</b>	1,5	160	7,18	1,000

Stupanj poželjnosti UFL u PECT (Tablica 30) varirao je od 0,943 do 1,000. Najvažnije zadržavanje UFL ostvaruje se primjenom čistog MD kao nosača, dodanog u omjeru 1,5 prema suhoj tvari ekstrakta te pri temperaturi 170°C.

#### 4.14. Rezultati određivanja ukupnih fenolnih spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

U PECT primjenom UPLC-MS/MS metode identificirano je ukupno 30 fenolnih spojeva koji pripadaju u pet različitih skupina fenolnih spojeva. Najzastupljenija skupina fenolnih spojeva su flavonoli zatim hidroksicimetne kiseline te flavanoli i flavoni dok su najmanje zastupljene hidroksibenzojeve kiseline (Tablica 31). Vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva dobivene su kao suma UHBK, UHCK, UFLO, UFLA i UFL.

**Tablica 31.** Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva (UPF) (mg/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv.e.	T sušenja (°C)	UPF
MD	0,5	120	3454,24 ± 95,75
		150	3663,23 ± 126,30
		180	4226,02 ± 59,97
	1	120	3125,11 ± 67,29
		150	3975,53 ± 144,09
		180	4146,76 ± 119,61
	2	120	3399,32 ± 48,52
		150	4041,36 ± 116,59
		180	3524,25 ± 145,11
MD + 25% GA	0,5	120	3992,82 ± 190,54
		150	4109,58 ± 142,79
		180	4164,72 ± 226,07
	1	120	4166,17 ± 181,89
		150	4157,58 ± 119,79
		180	4058,94 ± 57,88
	2	120	3718,69 ± 177,64
		150	4069,21 ± 112,36
		180	4104,43 ± 148,63

MD + 50% GA	0,5	120	3819,52 ± 157,39
		150	3494,63 ± 75,05
		180	3554,92 ± 122,31
	1	120	3415,35 ± 149,10
		150	3080,00 ± 104,52
		180	3527,06 ± 101,33
	2	120	2705,62 ± 129,20
		150	3785,83 ± 136,70
		180	3272,38 ± 45,61
MD + 25% IN	0,5	120	2911,47 ± 119,55
		150	3002,66 ± 143,17
		180	3157,59 ± 65,79
	1	120	2100,69 ± 113,94
		150	1314,75 ± 36,16
		180	1670,95 ± 34,99
	2	120	1547,64 ± 53,38
		150	1733,01 ± 62,83
		180	1864,92 ± 26,03
MD + 50% IN	0,5	120	1132,77 ± 46,64
		150	1448,09 ± 20,69
		180	2357,86 ± 65,14
	1	120	2098,23 ± 45,06
		150	2679,35 ± 136,82
		180	2569,87 ± 92,88
	2	120	2933,80 ± 41,78
		150	2627,47 ± 54,76
		180	3179,59 ± 87,88

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, koncentracija UF u PECT određen je u rasponu od 760,26-2763,18 mg/100g s.tv.e.. Najveća koncentracija UF određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD pri najvećoj temperaturi (180°C) i omjeru nosača te suhe tvari ekstrakta 0,5:1 dok je najmanja određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+25%IN pri temperaturi od 120°C i istom omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5:1). Općenito se može uočiti da je koncentracija UFL bila veća u prahovima pri nižim udjelima nosača, osim u prahovima sa MD+50% GA i MD+50% IN koji pokazuju obrnuti trend (2:1) i to pri višim temperaturama ( $T \leq 150^\circ\text{C}$ ).

**Tablica 32.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva (UPF) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

Parametri inkapsulacije	Ukupni fenolni spojevi (mg/100g s.tv.e.)
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p&lt;0,01</b>
MD	3728,43±89,58 <sup>bc</sup>
MD+25% GA	4060,07±42,02 <sup>c</sup>
MD+50% GA	3407,06±82,98 <sup>b</sup>
MD+25% IN	2185,66±149,31 <sup>a</sup>
MD+50% IN	2336,34±154,33 <sup>a</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv. ekstrakta</b>	<b>p=0,71</b>
0,5	3233,12±170,17 <sup>a</sup>
1	3096,91±165,61 <sup>a</sup>
2	3100,50±153,76 <sup>a</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>p=0,28</b>
120	2968,54±162,66 <sup>a</sup>
150	3169,76±171,04 <sup>a</sup>
180	3292,23±151,28 <sup>a</sup>

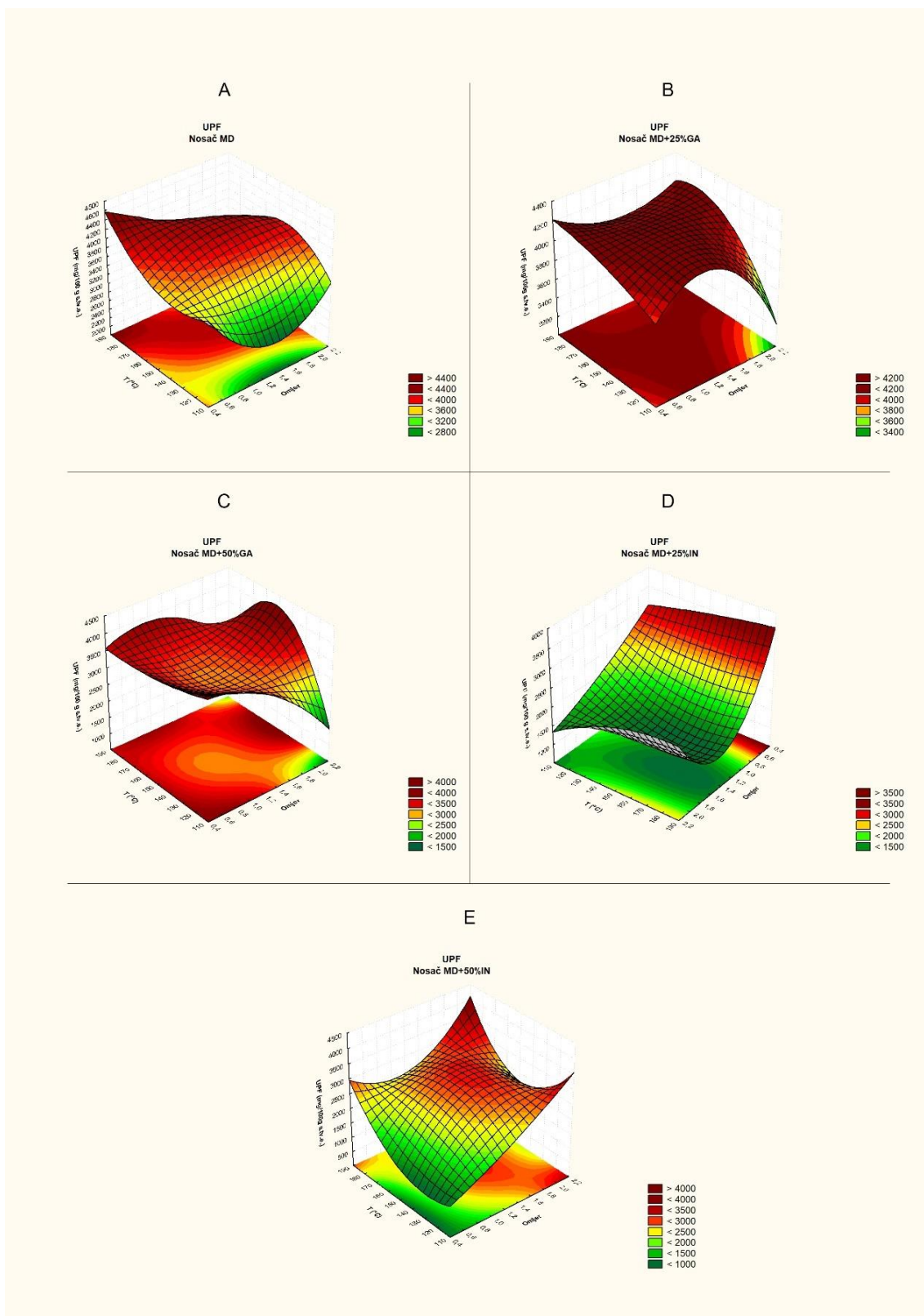
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Statističkom analizom (Tablica 32) dokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značaj na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u PECT ( $p \leq 0,05$ ). Minimalne vrijednosti koncentracija ukupnih fenolnih spojeva su postignute pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim sa MD+25% GA kao nosačem.

#### **4.15. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine**

Na *Slici 25* prikazan su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju UPF za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja, u skladu s rezultatima statističke analize. Vidljivo je da je svaki tip nosača pokazao drugačije različit trend promjene koncentracija UPF neovisno o omjeru i temperaturi sušenja.





**Slika 23.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentracije ukupnih fenolnih spojeva (UPF) u prahovima cvijeta trnine proizvedenim uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja

**Tablica 33.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela ukupnih fenolnih spojeva (UPF) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$26968,5 - 49210,0 X_1 + 15172,8 X_1^2 - 318,3 X_2 + 1,1 X_2^2 + 640,3 X_1X_2 - 2,0 X_1X_2^2 - 191,8 X_1^2X_2 + 0,6 X_1^2X_2^2$	0,957	0,919
<b>MD+25% GA</b>	$817,50 + 5792,60 X_1 - 3309,88 X_1^2 + 29,01 X_2 - 0,05 X_2^2 - 46,57 X_1X_2 + 0,07 X_1X_2^2 + 30,78 X_1^2X_2 - 0,06 X_1^2X_2^2$	0,583	0,212
<b>MD+50% GA</b>	$-6762,9 + 44082,3 X_1 - 24738,4 X_1^2 + 161,8 X_2 - 0,6 X_2^2 - 637,3 X_1X_2 + 2,2 X_1X_2^2 + 347,0 X_1^2X_2 - 1,2 X_1^2X_2^2$	0,932	0,871
<b>MD+25% IN</b>	$-7333,2 + 26779,1 X_1 - 11488,4 X_1^2 + 140,5 X_2 - 0,4 X_2^2 - 371,1 X_1X_2 + 1,0 X_1X_2^2 + 154,0 X_1^2X_2 - 0,4 X_1^2X_2^2$	0,991	0,983
<b>MD+50% IN</b>	$34022,4 - 71670,2 X_1 + 30515,5 X_1^2 - 502,0 X_2 + 1,8 X_2^2 + 1068,4 X_1X_2 - 3,7 X_1X_2^2 - 443,5 X_1^2X_2 + 1,5 X_1^2X_2^2$	0,993	0,987

Vrijednosti koeficijenta R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> za UPF (Tablica 33) za sve nosače osim MD+25%GA su iznad 0,85 što ukazuje na visoku točnost modela za predviđanje koncentracija ukupnih fenolnih spojeva. Te iznose kako slijedi: 0,957 (R<sup>2</sup>) i 0,919 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,932 (R<sup>2</sup>) i 0,871 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%GA; 0,991 (R<sup>2</sup>) i 0,983 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25%IN i 0,993 (R<sup>2</sup>) i 0,987 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%IN. U slučaju PECT s nosačem MD+25%GA vrijednost koeficijenta R<sup>2</sup> je 0,583 nije zadovoljavajuća dok je R<sup>2</sup><sub>adj</sub> vrijednost 0,212.

**Tablica 34.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih fenolnih spojeva (UPF) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mg/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	0,5	180	4226,04	0,964
<b>MD+25% GA</b>	2,0	180	4104,43	1,000
<b>MD+50% GA</b>	0,5	120	3827,71	0,916
<b>MD+25% IN</b>	0,5	180	3157,60	0,973
<b>MD+50% IN</b>	2,0	180	3179,60	0,971

Optimizacijom postupka inkapsulacije za svaki tip nosača (Tablica 34) uočava se da se najviši stupanj zadržavanja UPF postiže primjenom čistog MD u najnižem omjeru prema suhoj tvari ekstrakta pri temperaturi 180°C. Značajno niže koncentracije se ostvaruju ukoliko se IN koristi kao dodatak MD pri inkapsulaciji. Ostvaren stupanj poželjnosti koncentracije UPF u PECT varirao je od 0,916 do 1,000 ovisno o tipu nosača.

#### 4.16. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

**Tablica 35.** Antioksidacijski kapacitet mjereno ORAC metodom (mmol TE/100g s.tv.e.) u ekstraktima cvijeta trnine inkapsuliranim primjenom različitih nosača s različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta pri tri temperature sušenja

Nosač	Omjer nosača / s.tv. ekstrakta	T sušenja (°C)	ORAC (mmol TE/100g s.tv.e.)
MD	0,5	120	143,90 ± 3,99
		150	174,09 ± 6,00
		180	181,10 ± 2,59
	1	120	127,08 ± 2,74
		150	195,54 ± 7,09
		180	238,84 ± 6,89
	2	120	182,66 ± 2,61
		150	157,33 ± 6,88
		180	160,26 ± 6,60
MD + 25% GA	0,5	120	182,43 ± 8,72
		150	158,89 ± 5,48
		180	162,77 ± 8,85
	1	120	130,00 ± 5,69
		150	157,79 ± 4,55
		180	147,57 ± 2,11
	2	120	141,95 ± 6,79
		150	168,47 ± 4,67
		180	145,26 ± 5,27
MD + 50% GA	0,5	120	129,33 ± 5,33
		150	126,75 ± 2,73
		180	129,80 ± 4,48
	1	120	139,42 ± 6,10
		150	100,39 ± 5,46
		180	88,63 ± 2,56
	2	120	132,81 ± 6,35
		150	122,14 ± 4,43
		180	87,16 ± 1,22

MD + 25% IN	0,5	120	133,49 ± 5,50
		150	128,94 ± 6,17
		180	166,50 ± 3,48
	1	120	143,86 ± 7,82
		150	53,71 ± 1,16
		180	53,94 ± 1,13
	2	120	64,12 ± 2,21
		150	61,38 ± 2,23
		180	66,03 ± 0,92
MD + 50% IN	0,5	120	49,92 ± 2,06
		150	49,97 ± 0,71
		180	113,52 ± 3,15
	1	120	121,31 ± 2,61
		150	131,56 ± 6,75
		180	117,20 ± 4,25
	2	120	158,67 ± 2,27
		150	130,53 ± 2,73
		180	177,65 ± 4,93

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati mjerenja antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine (Poglavlje 3.2.6.) proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature (Tablica 35).

Ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja, ORAC vrijednosti u PECT određene su u rasponu od 49,92-238,84 mmol TE/100g s.tv.e. Najveća ORAC vrijednost određena je u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD pri najvećoj temperaturi (180°C) i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 dok je najmanja ORAC vrijednost određena u ekstraktima inkapsuliranim primjenom MD+50%IN pri temperaturi od 120°C i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1. Općenito se može uočiti da su u prahovima dobivenim primjenom smjese MD i GA, ORAC vrijednosti bile veće pri nižem udjelu GA, dok je suprotan trend vidljiv u prahovima dobivenim primjenom smjese nosača MD i IN.

**Tablica 36.** Utjecaj parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem na antioksidacijski kapacitet (mmol TE/100g s.tv.e.) u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

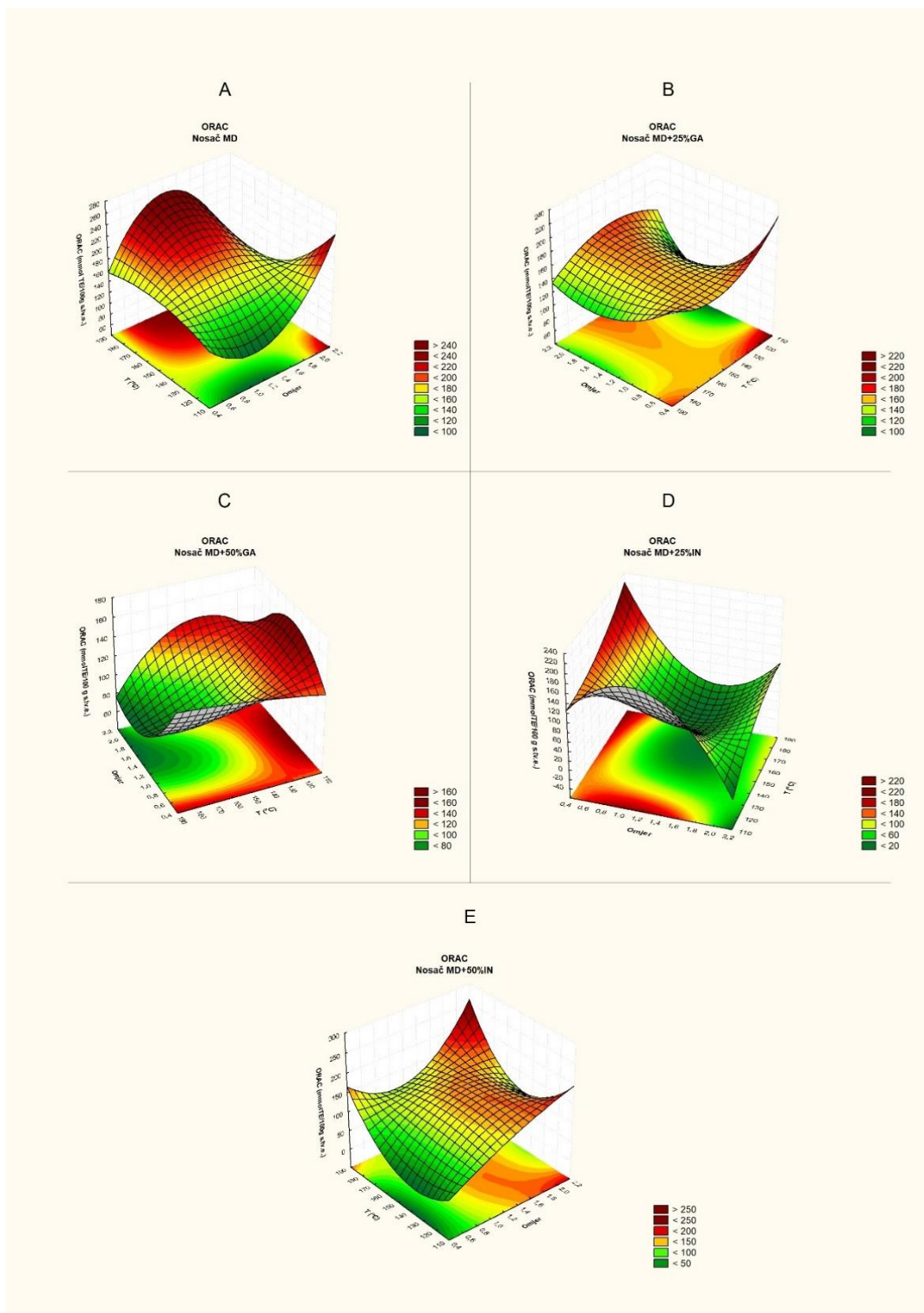
Parametri inkapsulacije	ORAC (mmol TE /100g s.tv.e.)
<b>Vrsta nosača</b>	<b>p&lt;0,01</b>
MD	173,42±7,45 <sup>b</sup>
MD+25% GA	155,01±3,73 <sup>b</sup>
MD+50% GA	117,38±4,61 <sup>a</sup>
MD+25% IN	96,88±10,38 <sup>a</sup>
MD+50% IN	116,70±9,87 <sup>a</sup>
<b>Omjer nosača i s.tv. ekstrakta</b>	<b>p=0,54</b>
0,5	135,42±7,37 <sup>a</sup>
1	129,79±8,59 <sup>a</sup>
2	130,43±7,52 <sup>a</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>p=0,84</b>
120	132,06±6,42 <sup>a</sup>
150	127,83±8,03 <sup>a</sup>
180	135,75±8,85 <sup>a</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. Vrijednosti s različitim malim slovom u superskriptu unutar istog stupca značajno se razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . \*=faktor je značajan u multifaktorskoj analizi

Na osnovi statističke analize (Tablica 36) dokazano je da samo vrsta nosača statistički značajno utječe na ORAC vrijednosti u PECT ( $p \leq 0,05$ ). Minimalne ORAC vrijednosti određene su pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim s MD i MD+25% GA kao nosačima.

#### **4.17. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na AOK mjeren ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine**

U skladu sa rezultatima statističke analize na *Slici 26* su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za ORAC vrijednosti za svaki tip nosača u ovisnosti o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja, iz kojih je vidljivo da je svaki tip nosača pokazao različit trend promjene ORAC vrijednosti neovisno o omjeru i temperaturi sušenja



**Slika 24.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet mjeren ORAC metodom (mmol TE/100 g s.t.v. ekstrakta) (ORAC) u prahovima cvijeta trnine proizvedene uz nosače MD (A), MD+25%GA (B), MD+50%GA (C), MD+25%IN (D) i MD+50%IN (E), u ovisnosti o omjeru suhe tvari nosača i ekstrakta te temperature sušenja



**Tablica 37.** Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela antioksidacijskog kapaciteta mjenog ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Jednadžba regresijskog modela	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>MD</b>	$429,42 - 1724,22 X_1 + 896,38 X_1^2 - 1,85 X_2 - 0,0 X_2^2 + 17,44 X_1X_2 - 0,03 X_1X_2^2 - 9,53 X_1^2X_2 + 0,02 X_1^2X_2^2$	0,985	0,971
<b>MD+25% GA</b>	$2037,62 - 3548,40 X_1 + 1149,47 X_1^2 - 23,54 X_2 + 0,07 X_2^2 + 44,39 X_1X_2 - 0,14 X_1X_2^2 - 14,23 X_1^2X_2 + 0,04 X_1^2X_2^2$	0,921	0,850
<b>MD+50% GA</b>	$-636,616 + 2125,176 X_1 - 920,362 X_1^2 + 9,400 X_2 - 0,026 X_2^2 - 26,528 X_1X_2 + 0,077 X_1X_2^2 + 11,737 X_1^2X_2 - 0,035 X_1^2X_2^2$	0,971	0,945
<b>MD+25% IN</b>	$-1239,42 + 4601,14 X_1 - 1953,45 X_1^2 + 15,48 X_2 - 0,04 X_2^2 - 55,74 X_1X_2 + 0,15 X_1X_2^2 + 23,70 X_1^2X_2 - 0,07 X_1^2X_2^2$	0,995	0,991
<b>MD+50% IN</b>	$2498,63 - 4591,30 X_1 + 1926,96 X_1^2 - 37,54 X_2 + 0,14 X_2^2 + 70,48 X_1X_2 - 0,25 X_1X_2^2 - 28,91 X_1^2X_2 + 0,10 X_1^2X_2^2$	0,996	0,992

Jednadžbe modela za predviđanje AOK pri odabranim uvjetima s pripadajućim koeficijentima determinacije R<sup>2</sup> i R<sup>2</sup><sub>adj</sub> prikazane su u Tablici 37. Vrijednosti koeficijenata su preko 0,8; što ukazuje na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje AOK vrijednosti. Te iznose kako slijedi: 0,985 (R<sup>2</sup>) i 0,971 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD; 0,921 (R<sup>2</sup>) i 0,850 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25%GA; 0,971 (R<sup>2</sup>) i 0,945 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%GA; 0,995 (R<sup>2</sup>) i 0,991 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+25%IN i 0,996 (R<sup>2</sup>) i 0,992 (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) za MD+50%IN.

**Tablica 38.** Optimizacija metodom poželjnosti antioksidacijskog kapaciteta mjenenog ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena vrijednost (mmol TE/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
<b>MD</b>	1,25	180	243,45	0,998
<b>MD+25% GA</b>	2,0	180	145,26	1,000
<b>MD+50% GA</b>	1,25	120	141,12	0,954
<b>MD+25% IN</b>	0,5	180	166,50	0,979
<b>MD+50% IN</b>	2,0	180	177,65	0,974

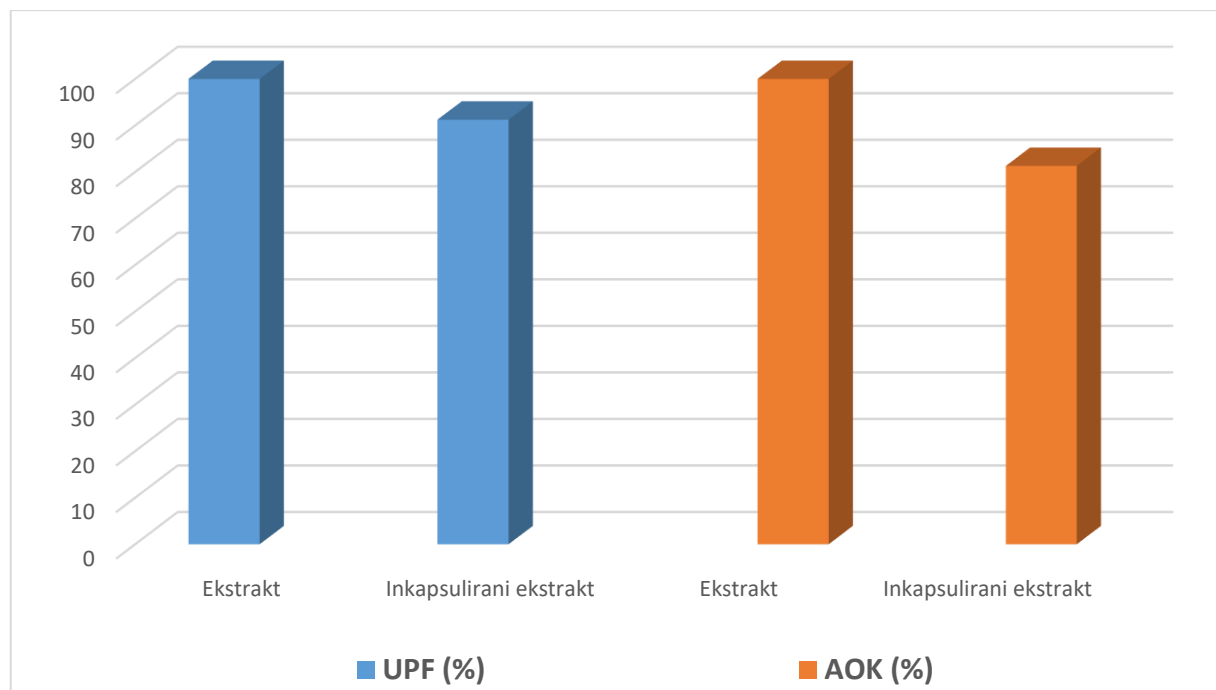
Prema rezultatima optimizacije uvjeta inkapsulacije za svaki tip nosača (Tablica 38), vidljivo je da se najviši antioksidacijski kapacitet PECT zadržava inkapsulacijom uz nosač MD, pri omjeru 1,25 i temperaturi 180°C. Dodatak GA i IN u smjesu nosača imao je negativan utjecaj na antioksidacijski kapacitet inkapsuliranih ekstrakata. Stupanj poželjnosti ORAC vrijednosti u PECT varirao je od 0,954 do 1,000; potvrđujući prikladnost optimizacijskih modela.

#### 4.18. Rezultati optimizacije inkapsulacijskih parametara primjenom metode odzivnih površina na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i pripadajuće ORAC vrijednosti u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

**Tablica 39.** Optimizacija metodom poželjnosti ukupnih fenolnih spojeva (UPF) i antioksidacijskog kapaciteta mjerenog ORAC metodom u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim primjenom različitih nosača s različitim omjerima suhe tvari nosača i ekstrakta pri tri temperature prema planu pokusa

Vrsta nosača	Omjer suhe tvari nosača i ekstrakta	Temperatura (°C)	Predviđena koncentracija UPF (mg/100g s.tv.e.)	Predviđena ORAC vrijednost (mmol TE/100g s.tv.e.)	Stupanj poželjnosti
MD	1,0	180	4146,76	238,84	0,928
MD+25% GA	1,75	180	4060,93	142,32	1,000
MD+50% GA	2,0	150	3785,83	122,14	0,792
MD+25% IN	0,5	180	3157,60	166,50	0,616
MD+50% IN	2,0	180	3179,60	177,65	0,972

S ciljem utvrđivanja inkapsulacijskih parametara za proizvod s maksimalnim zadržavanjem ukupnih fenolnih spojeva i maksimalnim antioksidacijskim kapacitetom provedena je istovremena optimizacija za navedene varijable (Tablica 39). Dobiveni rezultati su potvrdili prikladnost čistog MD kao optimalnog nosača za inkapsulaciju uz optimalan omjer 1 i temperaturu sušenja 180°C. Mješavinom MD+25% GA se ostvaruju neznatno niže koncentracije UPF, no dodatak GA značajno utječe na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta.



**Slika 25.** Usporedba zadržavanja (%) ukupnih fenolnih spojeva (UPF) i njihovog antioksidacijskog kapaciteta (AOK) u ekstraktu cvijeta trnine inkapsuliranom pri optimalnim uvjetima (nosač MD, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1, temperatura sušenja 180°C) u odnosu na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u početnom ekstraktu.

Na Slici 26 prikazana je usporedba sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta cvijeta trnine inkapsuliranog pri optimalnim uvjetima u odnosu na početni ekstrakt. U početnom ekstraktu određena je koncentracija UPF od 4544,01 mg/100g s.tv.e. te pripadajuća AOK vrijednost od 293,79 mmol TE/100g s.tv.e. U ekstraktu cvijeta trnine inkapsuliranom pri optimalnim uvjetima, dakle primjenom MD kao nosača, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 te temperaturi sušenja od 180°C, zadržavanje UPF iznosila je 91,24%, a AOK 81,30% u odnosu na početni ekstrakt.

## **5. RASPRAVA**

Inkapsulacija biljnih ekstrakata sušenjem raspršivanjem je zahtjevna metoda zbog visokog sadržaja termolabilnih fenolnih spojeva koje treba je očuvati tijekom sušenja. Stoga je važno odrediti optimalne parametre sušenja s krajnjim ciljem dobivanja praha koji će biti stabilan i sadržavati njihovu visoku koncentraciju. Pri proizvodnji praha biljnih ekstrakata prvi je korak odabir odgovarajućih nosača. Nosači osim što stabiliziraju fenolne spojeve, pružaju im termozaštitu i utječu na poboljšanje procesa sušenja raspršivanjem sprječavajući ljepljivost koja uzrokuje smanjenje efikasnosti samog procesa.

Ekstrakt cvijeta trnine odlikuje se relativno niskim udjelom ukupne suhe tvari u početnom vodenom ekstraktu od 3,16 % i visokim udjelom fenolnih spojeva među kojima su najzastupljeniji flavonoli i hidroksicimetne kiseline (Elez Garofulić i sur., 2018; Marchelak i sur., 2017). Navedene skupine fenolnih spojeva su izrazito osjetljive na povišene temperature te ih je zbog njihove biološke vrijednosti važno očuvati tijekom samog postupka. Stoga su u ovom istraživanju određeni optimalni uvjeti proizvodnje praha ekstrakta cvijeta trnine (PECT) pri kojima se postiže maksimalna efikasnost njihove inkapsulacije i njihov maksimalni antioksidacijski kapacitet. Određeno je na koji način vrsta nosača, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperatura sušenja utječu na njihovo zadržavanje i očuvanje antioksidacijskog kapaciteta u inkapsuliranom ekstraktu cvijeta trnine. Ispitan je utjecaj vrste nosača: maltodekstrina (MD) dekstroznog ekvivalenta 13-17, mješavine MD i 25% arapske gume (GA), mješavine MD i 50% GA, mješavine MD i 25% inulina (IN) te mješavine MD i 50% IN; te prema punom faktorijalnom dizajnu eksperimenta na tri razine utjecaj omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5; 1 i 2) i temperature sušenja (120, 150 i 180°C).

### 5.1. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine

Jedan od važnih ciljeva inkapsulacije sušenjem raspršivanjem je zadržavanje bioaktivnih spojeva u proizvodu s niskim sadržajem vlage. Osim što je nizak sadržaj vlage jedan od pokazatelja uspješnosti postupka sušenja raspršivanjem također je i pokazatelj stabilnosti te kvalitete dobivenog praha (Kathiman i sur., 2020).

Omjer nosača i suhe tvari ekstrakta ( $p < 0,01$ ) te temperatura sušenja ( $p = 0,02$ ) imali su statistički značajan učinak na smanjenje vlage u svim PECT (Tablica 7). Vrsta nosača nije pokazala statistički signifikantan učinak na sadržaj vlage u PECT ( $p = 0,22$ ).

U skladu s rezultatima statističke analize, na Slici 19 je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za sadržaj vlage u ovisnosti o statistički značajnim vrijednostima (omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te temperature sušenja) za sve primijenjene nosače. U PECT sa MD najniži sadržaj vlage imali su prahovi proizvedeni pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta većim od 1,4 što se može vidjeti na trodimenzionalnom prikazu odzivne površine (Slika 18-A) neovisno o temperaturi sušenja. Na Slici 18-B se može uočiti da je najniži sadržaj vlage određen u PECT sa MD+25% GA pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1,4-1,6 pri maksimalnoj temperaturi sušenja. Iz trodimenzionalnog prikaza odzivne površine PECT sa MD+50% GA vidljivo je da je najmanji sadržaj vlage postignut u prahovima dobivenim pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta od 1,2 do 1,8 pri maksimalnoj temperaturi sušenja (Slika 18-C). U PECT sa MD+25%IN najniži sadržaj vlage imali su prahovi proizvedeni pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta većim od 1,6 što se može vidjeti na trodimenzionalnom prikazu odzivne površine (Slika 18-D) i temperaturi sušenja većoj od 150°C. Na Slici 18-E se može uočiti da je najniži sadržaj vlage određen u PECT sa MD+50% IN pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta većim od 1,4 i temperaturama većim od 130°C. Općenito se može zaključiti da je sadržaj vlage bio niži pri višim temperaturama sušenja te pri višem udjelu nosača.

Značajan utjecaj temperature sušenja na sadržaj vlage u inkapsuliranim biljnim ekstraktima, potvrđen je brojnim istraživanjima. Susantikarn i Donlao (2016) ispitivali su utjecaj temperature sušenja (170, 190 i 210°C) na sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima zelenog čaja sa MD (3, 5 i 7%). Rezultati su pokazali da se sadržaj vlage smanjuje povećanjem temperature sušenja te je kod svih uzoraka, neovisno o udjelu MD, bio najmanji pri temperaturi

sušenja od 210°C (4,40-4,50 %). Povećanje temperature sušenja dovodi do povećanja stope isparavanja vode tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Tran i Nguyen (2018) također navode da se porastom temperature sušenja sa 110 na 150°C sadržaj vlage u prahovima ekstrakta lišća limunske trave smanjuje i to s 13,11 % na 8,49 %. Istraživanje Cegledi i sur. (2022) potvrdilo je naša saznanja da povećanje udjela nosača u biljnim ekstraktima dodanim prilikom sušenja raspršivanjem smanjuje sadržaj vlage inkapsuliranim prahovima. U navedenom istraživanju ekstrakt lišća koprive inkapsuliran je sušenjem raspršivanjem uz promjenjive omjere nosača i suhu tvar ekstrakta (1:1, 2:1 i 3:1) te je minimalan sadržaj vlage od 3,56% postignut pri maksimalnom omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta (3:1). Općenito inkapsulacija sušenjem raspršivanjem je učinkovitija ako se provodi uz primjenu nosača. Kiritsakis i sur. (2018) su utvrdili da je dodatak MD rezultirao nižim sadržajem vlage u prahovima lista masline što se može pripisati njegovoj sposobnosti da spriječi apsorpciju šećera sadržanih u prahovima ekstrakta koji su izrazito higroskopne prirode. Također su potvrdili smanjenje sadržaja vlage uslijed povećanja temperatura sušenja zbog bržeg prijenosa topline.

Iako rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajan utjecaj vrste nosača na sadržaj vlage prahova, neka istraživanja su pokazala suprotno. Tran i Nguyen (2018) su potvrdili niži sadržaj vlage u prahovima dobivenim s MD (7,5%) u odnosu na prahove dobivene sa mješavinom nosača MD+GA (8,5%) što se može objasniti činjenicom da se veći sadržaj vlage postiže pri većoj higroskopnosti praha budući da GA ima veću higroskopnost od MD (Şahin-Nadeem i sur., 2013). Pieczykolan i Kurek (2019) potvrdili su niži sadržaj vlage u prahovima ekstrakta ploda aronije s nosačem MD+IN (1,75%) u odnosu na prahove dobivene sa nosačem MD+GA (2,73%). Ove razlike u kapacitetima vezanja vode posljedica su broja hidrofilnih skupina prisutnih u pojedinom nosaču (Meyer i sur., 2011).

Adekvatnost modela provjerena je izračunom koeficijenta determinacije  $R^2$ . Predloženo je da model koji dobro pristaje treba imati  $R^2$  najmanje 0,80. Kao što se može primijetiti, svi modeli imali su  $R^2$  viši od 0,98 (Tablica 8), što implicira primjerenost modela za predviđanje sadržaja vlage u inkapsuliranim PECT. Također su sve  $R^2_{adj}$  vrijednosti bile blizu  $R^2$ , što ukazuje na zadovoljavajuću prilagodbu modela eksperimentalnim podacima (Elez Garofulić i sur., 2016).

Optimalni uvjeti inkapsulacije odabrani su na temelju postizanja najmanjeg sadržaja vlage u PECT istodobnom optimizacijom metodom poželjnosti (Tablica 9). Optimalni uvjeti pri kojima je postignut minimalan sadržaj vlage (1,96%) u PECT određeni su s nosačem



MD+25%IN, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 2:1 i temperaturi sušenja od 180°C. Neznatno više vrijednosti sadržaja vlage (2,05%) određeni su s nosačem MD+50%IN uz niži omjer 1,75 pri istoj temperaturi sušenja dok je dodatak arapske gume značajno je utjecao na povišenje sadržaja vlage u PECT pri istim uvjetima sušenja.

## 5.2. Profil fenolnih spojeva inkapsuliranih ekstrakata cvijeta trnine

U PECT proizvedenim prema eksperimentalnom dizajnu (Tablica 1, poglavlje 3.2.3.) identificirano je 30 fenolnih spojeva primjenom UPLC-MS/MS (Tablica 10) od čega 10 fenolnih kiselina i 20 flavonoida. Iz skupine hidroksibenzojevih kiselina identificiranja je samo galna kiselina, dok je iz skupine hidroksicimetnih kiselina identificirano 9 predstavnika: 3-*O*-kafeoilkina kiselina (neoklorogenska), 4-*O*-kafeoilkina kiselina, 3-*p*-kumaroilkina kiselina, 4-*p*-kumaroilkina kiselina, klorogenska kiselina, 3-*O*-feruloilkina kiselina, kafeniska kiselina, 5-*p*-kumaroilkina kiselina i ferulinska kiselina. Procijanidin B1, procijanidin B2, katehin i epikatehin su identificirani iz skupine flavanola. Najviše spojeva (14) identificirano je iz skupine flavonola i to: kamferol ramnozid heksozid, kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin pentozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol pentozil heksozid, izoramnetin rutinozid, kamferol pentozid, kamferol heksozid, kvercetin ramnozid, kamferol ramnozid, kvercetin acetil heksozid, kamferol acetil heksozid i miricetin. Iz skupine flavona identificiran je luteolin.

Elez Garofulić i sur. (2018) identificirali su fenolne spojeve iz ekstrakata cvijeta trnine (Poglavlje 3.2.5.). Iz skupine fenolnih kiselina, spojevi 10, 7 i 9, identificirani su usporedbom s njihovih retencijskih vremena i MS<sup>2</sup> spektralnih podataka s referentnim standardima kao galna, kafeinska i ferulinska kiselina. Spojevi 1, 4, 6 i 8 su identificirani pomoću njihovih MS<sup>2</sup> spektralnih podataka. Spoj 1 pokazao je isti uzorak fragmentacije kao spojevi 2 i 5, karakteriziran molekulskim ionom na  $m/z$  353 i fragment ionom na  $m/z$  191 koji odgovara ostatku kine kiseline, što implicira strukturu kafeoilkinih kiselina. Spoj 5 identificiran je kao klorogenska kiselina (5-*O*-kafeoilkina kiselina) autentičnim standardom i prijedlogom da se struktura 5-kafeoilkine kiseline karakterizira nemjerljivim sekundarnim pikom na  $m/z$  179,5 (Clifford i sur., 2003). Na isti način, spojevi 1 i 2 su stoga okarakterizirani kao neoklorogenska kiselina (3-*O*-kafeoilkina kiselina) i 4-*O*-kafeoilkina kiselina zbog prisutnosti sekundarnog pika na  $m/z$  179,5; a slijedom padajuće polarnosti. MS<sup>2</sup> spektri spojeva 3, 4 i 8 dali su molekularne ione na  $m/z$  337 s fragment ionima na  $m/z$  163, odnosno  $m/z$  173. Ovi obrasci fragmentacije su u skladu s onima prijavljenima za 3-*p*-kumaroilkinu kiselinu, 5-*p*-kumaroilkinu kiselinu i 4-*p*-kumaroilkinu kiselinu (Clifford i sur., 2003). Spoj 6 je karakteriziran molekularnim ionom pri  $m/z$  367 i MS<sup>2</sup> ionom pri  $m/z$  193, što ukazuje na molekularnu strukturu 3-feruloilkine kiseline (Clifford i sur., 2003). Među flavanolima, katehin, epikatehin te procijanidin B1 i B2 identificirani su u ekstraktima i prahovima cvijeta trnine. MS<sup>2</sup> spektralni podaci navedenih

spojeva bili su u skladu s onima iz autentičnih standarda korištenih za njihovu identifikaciju. Spojevi 17, 18 i 20 identificirani su kao kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid i kamferol-3-rutinozid, koristeći njihove spektralne podatke i uspoređujući njihova retencijska vremena s onima autentičnih standarda. Preostali spojevi su identificirani prema njihovim spektrima i literaturnim izvješćima. Spojevi 16, 19, 25 i 27 identificirani su kao kvercetin glikozidi zbog MS<sup>2</sup> baznog pika na  $m/z$  303. Potvrđeni su kao kvercetin pentozil heksozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  597), kvercetin pentozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  435), kvercetin ramnozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  449) i kvercetin acetil heksozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  507) temeljem specifičnih gubitaka koji odgovaraju gubitku pentoze (-132 amu), heksoze (-162 amu), ramnoze (-146 amu) i acetilnog ostatka (-42 amu) (Barros i sur., 2012; Pinheiro i Justino, 2012). Osim kamferol-3-rutinozida, identificirano je još pet kamferol glikozida, karakteriziranih MS<sup>2</sup> osnovnim pikom na  $m/z$  287. Ovi spojevi (15, 21, 22, 24, 26 i 28) su identificirani prema karakterističnim gubicima fragmenata kao kamferol ramnozil heksozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  595, gubitak od -142 i -162 amu), kamferol pentozil heksozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  581, gubitak -132 od -162 amu), kamferol heksozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  449, gubitak od -162 amu), kamferol ramnozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  433, gubitak i -162 amu), kamferol pentozid ([M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  419, gubitak od -146 amu) i kamferol acetil heksozid ([M+H]<sup>+</sup> za  $m/z$  491, gubitak -42 odnosno 162 amu). Spoj 23 je identificiran kao izorametin rutinozid zbog njegovog molekularnog iona na  $m/z$  625 i MS<sup>2</sup> fragmenta na  $m/z$  317, što ukazuje na strukturu izoramnetina i gubitak ramnoze (-146) i glukoze (-162). Spoj 29 potvrđen je autentičnim standardom kao miricetin. Iz skupine flavona, u ekstraktima cvijeta trnine identificirana je luteolin usporedbom s autentičnim standardom zajedno sa spektralnim podacima.

Iz Tablice 10 se može zaključiti da su flavonoli najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u PECT i to uglavnom kamferol i kvercetin glikozidi. Najviše koncentracije su određene za kamferol pentozid i kvercetin pentozid te kvercetin-3-rutinozid što je u skladu sa prethodnim istraživanjem Elez Garofulić i sur. (2018). Osim flavonola, veliki udio ukupno identificiranih fenolnih spojeva čine hidroksicimetne kiseline kojima je glavni predstavnik kafeinska kiselina. Koncentracije svakog od identificiranih spojeva ovisile su o primijenjenim uvjetima inkapsulacije.

### 5.2.1. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju hidroksibenzojevih kiselina u prahu ekstrakta cvijeta trnine

Kao jedini predstavnik hidroksibenzojevih kiselina u PECT, UPLC-MS/MS metodom identificirana je galna kiselina.

Statističkom analizom (Tablica 12) dokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značajan učinak na koncentraciju ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (UHBK) u PECT ( $p < 0,01$ ), dok omjer nosača i suhe tvari ekstrakta ( $p = 0,33$ ) te temperatura sušenja ( $p = 0,13$ ) nisu imali statistički značajan učinak.

Isto potvrđuju i trodimenzionalni prikazi odzivnih površina (Slika 19) za koncentraciju UHBK u PECT sa pet različitih nosača. Najveće koncentracije UHBK postignute su u PECT dobivenim s nosačem MD+50%GA, zatim padajućim slijedom MD+50%IN, MD+25%IN, MD+25%GA te najmanje s MD.

Dobiveni rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koje su proveli Ramírez i sur. (2015) koji su za inkapsulaciju galne kiseline iz prahova modela voćnog soka metodom sušenja raspršivanjem koristili nosače 100% MD, 100% GA i 50% MD/GA. Maksimalne eksperimentalne vrijednosti koncentracije inkapsulirane galne kiseline postignute su pri korištenju kombinacije nosača MD/GA jednakih omjera.

Robert i sur. (2012) inkapsulirali su galnu kiselinu (100% galnu kiselinu, Sigma) sušenjem raspršivanjem uz nosače nativni i acetilirani škrob te nativni i acetilirani inulin. Maksimalna retencija galne kiseline postignuta je u prahovima sa nativnim inulinom. Škrob i inulin su polisaharidi različitih struktura. Škrob je glukopiranozid koji ima linerane i razgranate zone, dok je inulin fruktooligosaharid čija je struktura uglavnom linearna sa malo razgranatih zona. Ova različitost u strukturi škroba i inulina može objasniti njihovu interakciju sa galnom kiselinom tj. bolju retenciju galne kiseline u inkapsulatima sa inulinom. Budući da je MD derivat škroba možemo na toj osnovi povezati slabiju retenciju galne kiseline s MD u odnosu na IN prema prije navedenom istraživanju.

Dobrinčić i sur. (2020) potvrdili su učinkovitiju inkapsulaciju galne kiseline s nosačem MD+GA u odnosu na MD+IN i MD kao i veću koncentraciju galne kiseline u inkapsulatima s MD+IN u odnosu na MD. Najveća koncentracija galne kiseline određena je u prahovima iz ekstrakta lista masline dobivenim s nosačem MD+GA (130,10 mg/g s.tv.) te u padajućem

slijedu u prahovima s MD+IN (126,07 mg/g s.tv.) te s nosačem MD (124,32 mg/g s.tv.). Stoga i ovo istraživanje dokazuje veću efikasnost inkapsulacije smjese nosača u odnosu na upotrebu pojedinačnog nosača. Sposobnost nosača da zaštiti inkapsulirane molekule povezana je s njihovom kemijskom strukturom. GA zbog svog razgranatog ugljikohidratnog lanca i male količine glikoproteina koji su kovalentno povezani, može djelovati i na hidrofилna i hidrofobna područja molekula što omogućava bolju zaštitu inkapsuliranih molekula.

Koeficijenti determinacije modela ( $R^2$ ) i prilagođeni koeficijenti determinacije modela ( $R^2_{adj}$ ) te jednadžbe za predviđanje vrijednosti koncentracije ukupnih HBK u PECT prikazane su u Tablici 13. Svi modeli imali su  $R^2$  viši od 0,97 što potvrđuje primjerenost modela za predviđanje koncentracije UHBK u inkapsuliranim PECT. Također su sve  $R^2_{adj}$  bile blizu vrijednosti  $R^2$ .

Na temelju optimizacije metodom poželjnosti, odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće koncentracije UHBK u PECT (Tablica 14). Maksimalna vrijednost UHBK (18,42 mg/100g s.tv.e.) određena je upotrebom MD+50%GA kao nosača pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1,75:1, temperaturi sušenja od 180°C uz stupanj poželjnosti 1,000. U istim uvjetima, u prahovima s manjim dodatkom 25% GA u MD određene su upola manje vrijednosti UHBK. Najniža koncentracija UHBK je predviđena u PECT s čistim MD pri omjeru 2:1 i maksimalnoj temperaturi sušenja. Općenito se može zaključiti da je dodatak GA i IN u smjesama sa MD pozitivno utjecao na povećanje UHBK u PECT u odnosu na čisti MD.

### 5.2.2. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju hidroksicimetnih kiselina u prahu ekstrakta cvijeta trnine

UPLC-MS/MS metodom identificirano je devet hidroksicimetnih kiselina: 3-*p*-kumaroilkina, klorogenska, 3-*O*-feruloilkina, 3-*O*-kafeoilkina (neoklorogenska), kafeinska, 4-*O*-kafeoilkina, 4-*p*-kumaroilkina, 5-*p*-kumaroilkina i ferulinska kiselina. Međusobni omjeri pojedinačnih kiselina su bili isti u svim prahovima bez obzira na uvjete sušenja, s različitim koncentracijama, dok su u nekim prahovima 3-*O*-kafeoilkina i 4-*O*-kafeoilkina kiselina bile ispod nivoa detekcije.

U svim proizvedenim PECT kao najzastupljenija je određena kafeinska kiselina, zatim 3-*p*-kumaroilkina, 3-*O*-feruloilkina, 3-*O*-kafeoilkina, 4-*p*-kumaroilkina, 4-*O*-kafeoilkina, klorogenska, 5-*p*-kumaroilkina te ferulinska kiselina.

Od pojedinačnih parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem samo je vrsta nosača imala signifikantan utjecaj na sve pojedinačne hidroksicimetne ( $p < 0,01$ ) i ukupne hidroksicimetne kiseline (UHCK), s iznimkom ferulinske kiseline kod koje vrsta nosača nije imala statistički značajan utjecaj ( $p = 0,06$ ). Na koncentraciju ferulinske kiseline statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) je imao samo omjer nosača i suhe tvari ekstrakta (Tablica 16). Na koncentraciju 5-*p*-kumaroilkine kiseline, s druge strane, osim utjecaja vrste nosača značajan utjecaj je utvrđen za omjer nosača i suhe tvari ekstrakta ( $p < 0,01$ ). Pri tom su maksimalne koncentracije ferulinske i 5-*p*-kumaroilkine kiseline određene u PECT pri maksimalnom omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta. Pozitivan utjecaj porasta udjela nosača na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina dokumentirali su Elez Garofulić i sur. (2017) pri inkapsulaciji soka višnje maraske sušenjem raspršivanjem sa MD dekstroznog ekvivalenta 13-17 (3:1) pri čemu je ostvarena njihovo maksimalno retencija od 93%.

Za sve identificirane pojedinačne i UHCK, izuzev ferulinske na čiju koncentraciju nije utjecala vrsta nosača, najveće vrijednosti koncentracija određene su u prahovima s MD+25% GA dok su najmanje koncentracije određene u PECT s MD+25% IN. Odstupanje od navedenog primijećeno je jedino kod koncentracija 4-*O*-kafeoilkine kiseline čije su maksimalne vrijednosti određene u PECT s MD+50% IN te minimalne upotrebom MD+50% GA kao nosača (Tablica 16).

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina (Slika 20) za koncentraciju UHCK u PECT primjenom pet različitih nosača može se uočiti su najveće koncentracije UHCK

postignute su u PECT dobivenim s nosačem MD+25%GA, zatim opadajućim slijedom MD, MD+50%GA, dok su u prahovima s IN, MD+25%IN i MD+50%IN, vrijednosti bile i do 50% manje.

Tomson i sur. (2020) su inkapsulirali sok lista hrena sušenjem raspršivanjem s nosačima MD i MD/GA u različitim omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta (20:80, 50:50, 80:20). Maksimalna retencija ukupnih fenolnih kiselina postignuta je u prahovima dobivenim s 20% nosača te su prahovi s nosačem MD/GA (3602 mg ekv. kafeinske kiseline/100 g s.tv.) sadržavali veću koncentraciju fenolnih kiselina u odnosu na prahove dobivene s MD (2925 mg ekv. kafeinske kiseline/100 g s.tv.). Navedeno istraživanje potvrđuje opažanja kako se primjenom mješavine nosača MD i GA ostvaruje bolje zadržavanje fenolnih kiselina. Tkacz i sur. (2020) ispitivali su koncentraciju fenolnih kiselina u inkapsuliranom soku pasjeg trna (*Hippophaë rhamnoides* L.) proizvedenom s nosačima MD i MD+IN (1:2 i 2:1). Sadržaj fenolnih kiselina u prahovima dobivenim s MD imao je najveće vrijednosti (3,00 mg/100 g s.tv) dok je niža koncentracija određena u prahovima s MD+IN (1:2), a najmanja primjenom nosača MD+IN (2:1) što se podudara sa našim rezultatima slabijeg zadržavanja UHCK u sustavima nosača koji su sadržavali IN. Martinić i sur. (2022) su odredili efikasnost inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina iz ekstrakta lišća maslačka (*Taraxacum officinale* L. Weber ex F.H. Wigg) uz pojedinačne nosače MD, GA i IN. Od navedenih nosača najveća koncentracija UHCK je određena kod GA (58,99 %), zatim značajno manja primjenom MD (20,03%) te IN (18,62%). Iz navedenom možemo zaključiti da će se efikasnost inkapsulacije UHCK povećati miješanjem MD i GA, odnosno smanjiti miješanjem MD i IN.

U Tablici 17 su prikazane jednadžbe modela za predviđanje koncentracije UHCK pri korištenim nosačima, omjerima nosača i suhe tvari ekstrakta te temperature sušenja, s pripadajućim koeficijentima determinacije  $R^2$  i prilagođenim koeficijentima determinacije modela ( $R^2_{adj}$ ). Modeli za nosače MD, MD+25%IN i MD+50%IN, imali su  $R^2$  viši od 0,97 što potvrđuje primjerenost modela za predviđanje koncentracije UHBK u inkapsuliranim PECT. Također su sve  $R^2_{adj}$  bile blizu vrijednosti  $R^2$ . U slučaju PECT s nosačem MD+50%GA vrijednost koeficijenta  $R^2$  je 0,883 je zadovoljavajuća dok je  $R^2_{adj}$  vrijednost 0,779. Dok je vrijednost koeficijenta  $R^2$  za PECT s nosačem MD+25%GA je ispod 0,8 ( $R^2=0,774$ ) dok je  $R^2_{adj}$  0,573, dakle što ukazuje na nezadovoljavajuću prilagodbu modela eksperimentalnim podacima.

Odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće koncentracije UHCK u PECT, temeljem optimizacije metodom poželjnosti (Tablica 18). Maksimalna vrijednost UHCK (1551,53 mg/100g s.tv.e.) određena je upotrebom MD kao nosača pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1,5:1, temperaturi sušenja od 160°C uz stupanj poželjnosti 1,000.

Neznatno niže vrijednosti koncentracije UHCK (1531,21 mg/100g s.tv.e.) određene su s nosačem MD+25%GA uz veći omjer 2, pri višoj temperaturi sušenja (180°C) dok je dodatak inulina značajno je utjecao na sniženje koncentracije UHCK u PECT. Povećanje udjela GA u smjesi nosača s MD utjecalo je smanjenje UHCK u PECT dok se uočava suprotan trend povećanjem udjela IN. Minimalna vrijednost UHCK predviđena je primjenom smjese MD s 25% IN, uz omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5 pri 180°C.



### 5.2.3. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavonola praha ekstrakta cvijeta trnine

U inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine identificirano je ukupno 14 flavonola, kamferol i kvercetin glikozida, od kojih su najzastupljeniji kamferol pentozid i kvercetin pentozid te kvercetin-3-rutinozid (rutin).

Na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih flavonola utjecala je vrsta nosača ( $p < 0,01$ ). Osim vrste nosača na pojedinačne flavonole statistički su značajno utjecali omjer nosača i suhe tvari ekstrakta te temperatura sušenja. Na koncentraciju kamferol pentozida osim vrste nosača utjecala je i temperatura sušenja ( $p = 0,05$ ) dok su na vrijednosti kvercetin-3-heksozida i kamferol ramnozida statistički značajno utjecali i omjer nosača i suhe tvari ekstrakta ( $p = 0,02$  i  $p = 0,04$ ) (Tablica 20). Na koncentraciju kvercetin-3-heksozida povećanje udjela nosača imao je negativan učinak, dok je suprotan trend uočen kod kamferol ramnozida te je kod maksimalnog omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (2:1) dokumentirana dvostruko veća koncentracija. Općenito, povećanje koncentracije nosača u početku može pozitivno utjecati na koncentraciju inkapsuliranih bioaktivnih tvari do određene točke nakon čega nastupi smanjenje zbog preopterećenja sustava za inkapsuliranje (Mohan i sur., 2015). Navedeno potvrđuju istraživanja Ho i sur. (2015) koji su dokumentirali porast zadržavanja fenolnih spojeva u inkapsuliranim ekstraktima ploda *Rhodomyrtus tomentosa* metodom sušenja raspršivanje od omjer 1:1 do 4:1, i zatim pad pri omjeru 5:1. Isti trend su potvrdili Elez Garofulić i sur. (2017) odnosno pri porastu omjera nosača i soka (MD 4-7 DE) sa 1:1 na 2:1 dokumentirali su pozitivan utjecaj na koncentraciju ukupnih flavonol glikozida pri inkapsulaciji soka višnje maraske sušenjem raspršivanjem, dok je pri omjeru 3:1 došlo po smanjenja koncentracije.

Isto potvrđuju i trodimenzionalni prikazi odzivnih površina (Slika 21) za koncentraciju UFLO u PECT sa pet različitih nosača. Najveće koncentracije UFLO postignute su u PECT dobivenim s nosačem MD+25%GA, zatim opadajućim slijedom MD, MD+50%GA, MD+50%IN te najmanje s MD+25%IN.

Tran i Nguyen (2018) su pri inkapsulaciji ekstrakta limunske trave ispitivali utjecaj vrste nosača na koncentraciju UFLO. U prahovima dobivenim s mješavinom MD+GA određene su veće vrijednosti UFLO (393,14 mg CE/100 g s.tv.) u odnosu na prahove ekstrakta limunske trave s MD (329,10 mg CE/100 g s.tv.) što je u skladu s našim rezultatima. U istraživanju kojeg su proveli Tomson i sur. (2020) na ekstraktima lista hrena metodom sušenja

raspršivanjem određivani su UFLO u odnosu na vrstu nosača. Vrijednosti UFLO u prahovima s mješavinom MD+GA bile niže (6303 mg CE/100g s.tv.) od vrijednosti u prahovima s MD (6686 mg CE/100g s.tv.), budući da je omjer MD:GA u nosaču bio 3:2, što potvrđuje naše rezultate nižeg sadržavanja pri višim udjelima GA.

Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za predviđanje koncentracije UFLO za korištene nosače, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja, prikazani su u Tablici 21. Vrijednost koeficijenata  $R^2$  i  $R^2_{adj}$  za sve nosače osim MD+25%GA, su iznad 0,97 što ukazuje na visoku točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija dok su njihove  $R^2_{adj}$  vrijednosti bile blizu  $R^2$  vrijednostima.  $R^2$  za PECT s nosačem MD+25%GA je bila ispod 0,8 (0,750) dok je  $R^2_{adj}$  0,527 što ukazuje na slabiju preciznost modela eksperimentalnim podacima.

Optimalni uvjeti inkapsulacije odabrani su na temelju postizanja najvećeg sadržaja UFLO u PECT optimizacijom metodom poželjnosti (Tablica 22). Optimalni uvjeti pri kojima je postignut maksimalna vrijednost UFLO u PECT od 2763,02 mg/100g s.tv.e. određeni su s nosačem MD, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1 i temperaturi sušenja od 180°C. U inkapsuliranim ekstraktima s dodatkom arapske gume određene su više vrijednosti UFLO u odnosu na one koji je dodan inulin. Povećanje udjela GA u smjesi nosača s MD utjecalo je pozitivno na UFLO u PECT dok je povećanje udjela IN u smjesi imalo negativan efekt. Minimalna vrijednost UFLO predviđena je primjenom smjese MD s 50% IN, uz najveći omjer nosača i suhe tvari ekstrakta (2) i najveću temperaturu sušenja (180°C).

#### 5.2.4. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavanola praha ekstrakta cvijeta trnine

Katehin, epikatehin, procijanidin B1 i procijanidin B2 su identificirani flavanoli u PECT. Udjeli pojedinačnih flavanola su bili isti u svim prahovima bez obzira na uvjete sušenja, no u nekim prahovima koncentracija procijanidin B1 je bila ispod nivoa detekcije. U najvećem udjelu zastupljen je katehin, a u padajućem nizu slijede epikatehin, procijanidin B1 i procijanidin B2 neovisno o uvjetima sušenja.

Od pojedinačnih parametara inkapsulacije sušenjem raspršivanjem samo je vrsta nosača imala signifikantan utjecaj ( $p < 0,01$ ) na sve pojedinačne i ukupne flavanole (UFLA). (Tablica 24), dok je na koncentraciju procijanidina B2 osim vrste nosača statistički značajno utjecala i temperatura sušenja ( $p = 0,03$ ). Za razliku od većine pojedinačnih i ukupnih flavanola, kod kojih su maksimalne vrijednosti određene primjenom MD+25%GA, a minimalne uz 50% dodatak IN, na koncentraciju procijanidina B2 u inkapsuliranim ekstraktima je uočen suprotan trend. Nadalje, povećanje temperature sušenja pozitivno je utjecao na sadržaj procijanidina B2 u PECT. Zokti i sur. (2016) su također uočili značajan pozitivan utjecaj temperature sušenja ( $> 150^{\circ}\text{C}$ ) na koncentraciju ukupnih katehina u inkapsuliranom ekstraktu malezijskog zelenog čaja iz gorja Kameron.

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina (Slika 22) za koncentraciju UFLA u PECT primjenom pet različitih nosača može se uočiti da su najveće koncentracije UFLA postignute su u PECT dobivenim s nosačem MD+25%GA, zatim padajućim slijedom MD, MD+50%GA, dok su u prahovima MD+25%IN i MD+50%IN, vrijednosti bile i do 50% manje.

Zokti i sur. (2016) su ispitali efikasnost inkapsulacije ukupnih flavanola iz zelenog čaja upotrebom nosača MD i MD+GA u različitim omjerima (50:50, 75:25, 25:75). Mješavina MD+GA je rezultirala boljom inkapsulacijom ukupnih flavanola u odnosu na MD. Nadalje, zabilježen je trend povećanja efikasnosti inkapsulacije flavanola zelenog čaja s povećanjem udjela GA u mješavini MD+GA što se djelomično slaže sa našim rezultatima budući da su u PECT s MD+25%GA određene najveće vrijednosti flavanola te padajućim slijedom u prahovima s MD te prahovima s MD+50%GA. Ova razlika u rezultatima može se objasniti različitim sastavom i udjelom prisutnih pojedinih flavanola u PECT (49% katehina, 34% epikatehina, 17% procijanidin B1 i 1% procijanidina B2 u odnosu na ukupne flavanole) i u

ekstraktima zelenog čaja (44% epigalokatehingalata, 36% epigalokatehina, 10 % epikatehingalat, 8% epikatehina i 2% katehina ukupnih flavanola) (Gadkari i Balaraman, 2015).

Rezultate slične našima su dobili Michalska i sur. (2019) koji su odredili koncentraciju ukupnih flavanola u prahovima soka crnog ribizla u čijem sastavu dominira katehin. Koncentracija ukupnih flavanola najveća je bila u prahovima dobivenim s MD (5546,5 mg/kg s.tv.) te padajućim slijedom u prahovima s nosačem MD+IN pri omjeru 2:1 (1785,0 mg/kg s.tv.) i u prahovima s nosačem MD+IN pri omjeru 1:2 (1654,7 mg/kg s.tv.).

Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za predviđanje koncentracije UFLA za korištene nosače, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature sušenja, prikazani su u Tablici 25. Vrijednost koeficijenata  $R^2$  i  $R^2_{adj}$  za sve nosače osim MD+25%GA, su iznad 0,88 što ukazuje na visoku točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija dok su njihove  $R^2_{adj}$  vrijednosti bile blizu  $R^2$  vrijednostima.  $R^2$  za PECT s nosačem MD+25%GA je bila ispod 0,8 (0,774) dok je  $R^2_{adj}$  0,573 što ukazuje na slabiju precioznost modela eksperimentalnim podacima.

Na temelju optimizacije metodom poželjnosti, odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće koncentracije UFLA u PECT (Tablica 26). Optimalni uvjeti pri kojima je postignuta najveća vrijednost UFLA (162,52 mg/100g s.tv.e.) u PECT određeni su s nosačem MD+25%GA, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 i temperaturi sušenja od 180°C. Neznatno niže vrijednosti koncentracije UFLA (161,37 mg/100g s.tv.e.) određene su s nosačem MD uz veći omjer 1,75, a pri istoj temperaturi sušenja (180°C) dok je dodatak inulina značajno utjecao na sniženje koncentracije UFLA u PECT, čak više od 50% od koncentracije pri optimalnim uvjetima. Minimalna vrijednost UFLA predviđena je primjenom smjese MD s 50% IN, uz najveći omjer nosača i suhe tvari ekstrakta pri najnižoj temperaturi (120°C).

### 5.2.5. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju flavona cvijeta trnine

Luteolin je identificiran kao jedini predstavnik flavona u svim PECT (Tablica 10).

Statističkom analizom (Tablica 28) dokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značaj na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih flavona (UFL) u PECT ( $p < 0,01$ ). Minimalne vrijednosti koncentracija pojedinačnih i UFL su postignute pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim sa MD+25% GA kao nosačem.

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina (Slika 23) za koncentraciju UFL u PECT primjenom pet različitih nosača može se uočiti da su najveće koncentracije UFL postignute u PECT dobivenim s nosačem MD+25%GA, zatim padajućim slijedom MD, MD+50%GA, dok su u prahovima s MD+50%IN i MD+25%IN vrijednosti bile i do 50% manje.

Bušić i sur. (2018) su odredili koncentraciju derivata luteolina u inkapsuliranim ekstraktima listova ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L ili *Salvia rosmarinus* L) primjenom mješavine MD s proteinima sirutke (WPI) (2% i 4%) metodom sušenja raspršivanjem. Povećanjem udjela WPI u mješavini nosača MD+WPI smanjio se sadržaj derivata luteolina. Razlike u efikasnosti inkapsulacije pojedinih fenolnih spojeva ukazuju na njihovu različitu osjetljivost na emulgiranje i termičku izloženost stoga se može zaključiti da je luteolin vrlo osjetljiv fenolni spoj.

Jednadžbe modela za predviđanje koncentracije ukupnih flavona pri odabranim nosačima, omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta te temperature sušenja, s pripadajućim koeficijentima determinacije  $R^2$  i  $R^2_{adj}$  prikazane su u Tablici 29. Vrijednosti svih koeficijenata  $R^2$  su preko 0,97; osim za PECT s MD+25%GA, što ukazuje na vrlo visoku točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija. Za PECT s MD+25%GA vrijednosti  $R^2 > 0,8$  i ( $R^2_{adj} = 0,757$ ) za MD+25%GA su ukazale na zadovoljavajuću točnost modela za predviđanje koncentracija UFL.

Odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće koncentracije UFL u PECT, temeljem optimizacije metodom poželjnosti (Tablica 30). Najveća vrijednost UFL (13,72 mg/100g s.tv.e.) određena je upotrebom MD kao nosača pri omjeru nosača i suhe

tvori ekstrakta 1,5:1, temperaturi sušenja od 170°C uz stupanj poželjnosti 1,000. U inkapsuliranim ekstraktima s dodatkom arapske gume određene su više vrijednosti UFL u odnosu na one u koje je dodan IN. Povećanje udjela GA i IN u smjesi nosača s MD utjecalo je pozitivno na koncentraciju UFL u PECT. Nadalje, najmanja vrijednost UFL predviđena je primjenom smjese MD sa 25% IN, uz omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5 pri 150°C.

### 5.2.6. Utjecaj inkapsulacijskih parametara na sastav i koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva cvijeta trnine

Ukupne fenolne spojevi cvijeta trnine sačinjavaju hidroksibenzojeve i hidroksicimetne fenolne kiseline, te flavonoli, flavanoli i flavoni.

Statističkom analizom (Tablica 32) dokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u PECT ( $p < 0,01$ ) za razliku od omjera nosača i suhe tvari ekstrakta ( $p = 0,71$ ) te temperature sušenja ( $p = 0,28$ ). Minimalne vrijednosti koncentracija ukupnih fenolnih spojeva su postignute pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim s MD+25% GA kao nosačem.

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina (Slika 24) za koncentraciju UPF u PECT primjenom pet različitih nosača može se uočiti su najveće koncentracije UFL postignute su u PECT dobivenim s nosačem MD+25%GA, zatim padajućim slijedom MD, MD+50%GA, dok su u prahovima s MD+50%IN i MD+25%IN, vrijednosti bile i do 50% manje. Tuan i sur. (2016) su potvrdili bolju retenciju ukupnih fenolnih spojeva s nosačem MD/GA (3:1) u odnosu na čisti MD. U inkapsuliranom ekstraktu svježeg lista guave (*Psidium guajava*) s mješavinom MD/GA (3:1) vrijednost ukupnih fenolnih spojeva iznosila je 9237,3 mg GAE/100g s.tv. dok je u prahovima s MD iznosila 8250,6 mg GAE/100g s.tv., što je u skladu s rezultatima ovog rada. Tomson i sur. (2020) su također pri inkapsulaciji fenolnih spojeva iz soka lista hrena potvrdili bolju retenciju mješavine MD/GA u odnosu na MD. Bolja retencija ukupnih fenolnih spojeva može se objasniti korištenjem nosača veće molekularne težine (MD 41,64 g/mol; GA 617,32 g/mol), što je omogućilo brže stvaranje suhog filma na površini mikrokapsule (Zhang i sur., 2020). Turkiewicz i sur. (2020) su ispitali sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u prahovima ploda japanske dunje dobivene metodom sušenja raspršivanjem s nosačima MD i MD+IN (omjeri 1:2 i 2:1). U prahovima s MD koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je bila najveća (960,8.7 mg/100g s.tv.), dok su u prahovima s MD+IN određene niže koncentracije (850,4 mg/100g s.tv. pri omjeru 1:2 i 775,9 mg/100g s.tv. pri omjeru 2:1), na što ukazuju i rezultati ovog rada. Nadalje, Dobrinčić i sur. (2020) inkapsulirali su fenolne spojeve ekstrakta lista masline sušenjem raspršivanjem primjenom različitih nosača (MD+GA i MD+IN). Efikasnost retencije ukupnih fenolnih spojeva bila je veća kod prahova s MD+GA (130,10 mg/g s.tv.) u odnosu na MD+IN (126,07 mg/g s.tv.).

Vrijednosti koeficijenta  $R^2$  ( $R^2_{adj}$ ) za sve nosače, osim MD+25%GA, su iznad 0,93 (0,87) što ukazuje na visoku točnost modela za predviđanje njihovih koncentracija (Tablica 33). U PECT s nosačem MD+25%GA vrijednost koeficijenta  $R^2$  je 0,583 nije zadovoljavajuća dok je  $R^2_{adj}$  vrijednost 0,212.

Na temelju optimizacije metodom poželjnosti, odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće koncentracije UPF u PECT (Tablica 34). Optimalni uvjeti pri kojima je postignuta najveća vrijednost UPF (4226,04 mg/100g s.tv.e.) u PECT određeni su s nosačem MD, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1 i temperaturi sušenja od 180°C. Prva niža vrijednost koncentracije UPF od 4104,04 mg/100g s.tv.e. određena je u inkapsuliranim ekstraktima s 25%-tnim dodatkom arapske gume pri istoj temperaturi ali najvećem omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta. Udio IN u smjesi nosača znatno je utjecao na smanjenje UPF, te je najniža vrijednost UPF predviđena primjenom dodatka 25% IN pri omjeru 0,5 i najvišoj temperaturi.



### 5.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta cvijeta trnine

Visoki antioksidacijski potencijal cvijeta trnine dokazan je izmjerenom vrijednošću kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u početnom ekstraktu cvijeta trnine od 293,79 mmol TE/100 g s.tv.e., dok su ORAC vrijednosti u PECT određene u rasponu od 49,92-238,84 mmol TE/100g s.tv.e. ovisno o primijenjenim uvjetima sušenja.

Prema našim saznanjima, ovo su prvi rezultati određivanja AOK cvijeta trnine primjenom ORAC metode. Do sada su se literaturno najviše koristile DPPH i FRAP metode (Lovrić i sur., 2017; Marchelak i sur., 2017; Sönmez i sur., 2021). Lovrić i suradnici (2017) i Marchelak i suradnici (2017) su odredili AOK ekstrakta cvijeta trnine DPPH (3826,4  $\mu\text{mol/L}$  Trolox ekvivalent; 51,32  $\mu\text{g/mL}$ ) i FRAP metodom (1971.0 mg/L ekvivalent askorbinske kiseline; 9,46 mMFe<sup>2+</sup>/g).

Osim navedenih metoda Sönmez i sur. (2021) su odredili antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.subsp. *dasyphylla* (schur) Domain) sa područja pokrajne Çanakkale u zapadnoj Turskoj i CUPRAC i ABTS/TEAC metodom. Za ekstrakciju fenolnih spojeva su koristili četiri otapala metanol, etil acetat, diklorometan i *n*-heksan. Najveća koncentracija fenolnih spojeva je određena u metanolnom ekstraktu cvijeta trnine i izmjeren najveći AOK FRAP metodom 518,20 mMFe<sup>2+</sup>/g ekstrakta. Najveća antioksidacijska vrijednost ekstrakta cvijeta trnine s heksanom izmjerena je DPPH i CUPRAC metodom (850 IC<sub>50</sub>= $\mu\text{g/mL}$  i 0,34 QERFC), dok je najveća vrijednost ABTS/TEAC metodom određena u ekstraktu cvijeta trnine s etil-acetatom (144.57 mM TR/g ekstrakta). Iz navedenog su zaključili da AOK značajno ovisi o primijenjenom otapalu.

Dragović-Uzelac i sur. (2007) odredili su antioksidacijski kapacitet pojedinih plodova među kojima je bio i plod trnine ATBS, DPPH, FRAP i ORAC metodom. Dokazali su direktnu povezanost AOK fenolnih spojeva određenog DPPH i ORAC metodom dok je povezanost bila slabija primjenom FRAP metode te nije bila uočena primjenom ATBS. ORAC vrijednosti ekstrakta ploda trnine iznosile su u rasponu 68,76-89,39 mmol TE/kg voća.

Postoji nekoliko istraživanja antioksidativnog kapaciteta cvijeća biljaka ORAC metodom. Jedno od navedenih su proveli Garzón i sur. (2015) na jestivim laticama cvjetova dragoljuba (*Tropaeolum majus*) različitih boja. Najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva i ORAC vrijednost je određena u crvenim cvjetovima (18719  $\mu\text{mol TE/100 g FW}$ ). Lo Bosco i

sur. (2019) odredili su AOK fenolnih spojeva u neotvorenim cvjetnim pupoljcima kapara inkapsularanih sušenjem smržavanjem (*Capparis spinosa* L.) (655,98  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv.}$ ). Makarova i sur. (2021) su odredili AOK fenolnih spojeva iz ekstrakta cvjeta gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) ORAC metodom nakon sušenja na zraku (5214  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ ) i nakon liofilizacije (3313  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ ).

Ovisno o uvjetima sušenja, zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta ukupnih fenolnih spojeva određenih ORAC metodom iznosio je 17,0-81,3% u odnosu na početni ekstrakt cvijeta trnine.

Statističkom analizom (Tablica 36) dokazano je da samo vrsta nosača ima statistički značaj na AOK u PECT ( $p < 0,01$ ). Minimalne vrijednosti koncentracija ukupnih fenolnih spojeva su postignute pri korištenju MD+25% IN kao nosača, dok su maksimalne vrijednosti određene u prahovima dobivenim s MD, te nešto niže s MD+25% GA.

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina (Slika 26) za ORAC vrijednosti u PECT primjenom pet različitih nosača može se uočiti su najveće ORAC vrijednosti određene u PECT dobivenim s nosačem MD, zatim padajućim slijedom, MD+25% GA i MD+50% GA, dok su u prahovima s MD+50% IN i MD+25% IN znatno manje.

Ferrari i sur. (2012) su ispitali učinak različitih nosača (MD i MD+GA) na antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom u prahovima ploda kupine dobivenim sušenjem raspršivanjem. Uočili su da prahovi s MD imaju veće ORAC vrijednosti (266,58  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  suhog sok) u odnosu na prahove koji su dobiveni s MD+GA (257,22  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  suhog sok), što su pokazali i rezultati ovog rada. Righi da Rosa i sur. (2021) su inkapsulirali fenolne spojeve iz ekstrakta plodova borovnice metodom sušenja raspršivanjem upotrebom smjese nosača MD i hi-kukuruza te triju smjesa MD i hi-kukuruza sa dodatkom IN (1), sa dodatkom GA (2) i dodatkom smjese IN+GA (3). Njihovi rezultati potvrđuju naša saznanja o utjecaju dodatka GA i IN na AOK u PECT, pa su tako odredili veće ORAC vrijednosti u prahovima s dodatkom GA (112,36  $\mu\text{mol Trolox}/\text{g s.tv.}$ ) u odnosu na prahove s dodatkom IN (87,05  $\mu\text{mol Trolox}/\text{g s.tv.}$ ).

Jednadžbe modela za predviđanje ORAC vrijednosti pri odabranim uvjetima s pripadajućim koeficijentima determinacije  $R^2$  i  $R^2_{\text{adj}}$  prikazane su u Tablici 37. Vrijednosti koeficijenata su preko 0,92, što ukazuje na visoku točnost modela za predviđanje ORAC vrijednosti. Također su vrijednosti svih  $R^2_{\text{adj}}$  bile vrlo blizu  $R^2$ , osim kod prahova sa nosačem MD+25%GA gdje su odstupanja veća.

Odabrani su optimalni uvjeti inkapsulacije s ciljem postizanja najveće ORAC vrijednosti u PECT, temeljem optimizacije metodom poželjnosti (Tablica 38). Optimalni uvjeti pri kojima je postignuta najveća ORAC vrijednost (243,45 mmol TE/100g s.tv.e.) u PECT određeni su s nosačem MD, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1,25:1 i temperaturi sušenja od 180°C. Dodatak GA u smjesu nosača značajno je smanjio antioksidacijski kapacitet neovisno o omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta i temperaturi sušenja, te je najniža vrijednost predviđena u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine s 50%-tnim dodatkom GA. Iako je dodatak IN također značajno smanjio AOK u odnosu na vrijednost predviđenu pri optimalnim uvjetima, ORAC vrijednosti su ipak bile veće od onih predviđenih dodatkom GA u smjesu.

#### 5.4. Simultana optimizacija ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta inkapsuliranom ekstraktu cvijeta trnine

Također su odabrani i optimalni uvjeti inkapsulacije na temelju postizanja najvećeg sadržaja UPF i ORAC vrijednosti u PECT istodobnom optimizacijom metodom poželjnosti (Tablica 39). Optimalni uvjeti pri kojima je postignuta najveća vrijednost UPF (4146,76 mg/100g s.tv.e.) i ORAC vrijednost (238,84 mmol TE/100g s.tv.e.) u PECT određeni su s nosačem MD, pri omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 i temperaturi sušenja od 180°C. Primjena MD+25%GA uz viši omjer 1,75 pri istoj maksimalnoj temperaturi rezultirala je neznatno nižim vrijednostima koncentracije UPF (4060,93 mg/100g s.tv.e.) uz značajno nižu ORAC vrijednost (142,32 mmol TE/100g s.tv.e.). Dodatno povećanje udjela GA (50%) u smjesi nosača s MD utjecalo je i dodatno na smanjenje i UPF i njihovog antioksidacijskog kapaciteta čija je najniža vrijednost predviđena upravo u tim prahovima. Nadalje, dodatak IN u smjesu nosača sa MD značajno je utjecalo i na smanjenje UPF dok su ORAC vrijednosti bile veće nego u prahovima sa dodatkom GA.

Optimalni uvjeti inkapsulacije omogućili su visoko zadržavanje ukupnih fenolnih spojeva od 91,24% u odnosu na njihov sadržaj u početnom ekstraktu (Slika 26). Slične rezultate visokog zadržavanja UPF (od 92%) dokumentirali su Ribeiro i sur. (2019), Navarro-Flores i sur. (2020) te Yeop i sur. (2021) potvrđujući prikladnost inkapsulacije fenolnih spojeva biljnih ekstrakata metodom sušenja raspršivanjem. Nadalje, Dadi i sur. (2020) dokumentirali su bolje zadržavanje fenolnih spojeva ekstrakta lista *Moringa stenopetala* inkapsuliranih metodom sušenja raspršivanjem u odnosu na inkapsulaciju metodom sušenja smrzavanjem.

Zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta fenolnih spojeva nakon procesa sušenja raspršivanjem jedan je od važnih pokazatelja učinkovitosti procesa inkapsulacije (Akbarbaglu i sur., 2019). Primjenom optimalnih uvjeta inkapsulacije ekstrakta cvijeta trnine omogućeno je zadržavanje od 81,30% AOK u inkapsuliranim ekstraktima u odnosu na početni ekstrakt (Slika 26).

Slične rezultate dokumentirali su i drugi autori. Tan i sur. (2015) su također usporedili antioksidacijski kapacitet ukupnih fenolnih spojeva određen FRAP metodom (85,7%) pri optimalnim uvjetima inkapsulacije sušenjem raspršivanjem vodenog ekstrakta gorke dinje u odnosu na početni ekstrakt. Nadalje, Tengse i sur. (2017) optimirali su inkapsulaciju ekstrakta zelenog čaja (*Camellia sinensis* L.) metodom sušenja raspršivanjem te je pri optimalnim

uvjetima određena ukupna antioksidacijski kapacitet od 72,91% aktivnosti hvatanja slobodnih radikala metodom DPPH s poželjnošću od 0,92.

Razlike među vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenim u svakom pojedinom istraživanju u inkapsuliranim ekstraktima bogatim fenolnim spojevima mogu se pripisati koncentraciji inkapsuliranih fenolnih spojeva i vrsti fenolnih spojeva koji su inkapsulirani. Štoviše, naši su rezultati pokazali da inkapsulirani ekstrakti cvijeta trnine imaju visok potencijal za upotrebu kao antioksidacijski sastojci u formulacijama funkcionalnih pića i prehrambenih proizvoda. Nadalje, iako je ORAC metoda skupa metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta biljnih ekstrakata i hrane, njena primjena je opravdana točnošću antioksidacijskog kapaciteta bioaktivnih spojeva u *in vivo* uvjetima (Jaffe i Mani, 2018).

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata koji su dobiveni ovim istraživanjem i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Sadržaj vlage u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine značajno je ovisio o primijenjenoj temperaturi sušenja i udjelu nosača pokazujući trend smanjenja pri višim udjelima nosača i višoj temperaturi sušenja neovisno o vrsti nosača.
- UPLC-MS/MS metodom identificirano je ukupno 30 fenolnih spojeva koji pripadaju sljedećim skupinama:
  - Hidroksibenzojeve kiseline: galna kiselina kao jedini predstavnik
  - Hidroksicimetne kiseline: najzastupljenija je kafeinska kiselina, te u padajućem nizu slijede 3-*p*-kumaroilkina kiselina, te u padajućem nizu slijede 3-*O*-kafeoilkina kiselina (neoklorogenska), 3-*O*-feruloilkina kiselina, 4-*p*-kumaroilkina kiselina, klorogenska kiselina, 5-*p*-kumaroilkina kiselina, ferulinska kiselina i 4-*O*-kafeoilkina kiselina
  - Flavanoli: najzastupljeniji su katehin, zatim slijede epikatehin, procijanidin B1 i najmanje je zastupljen procijanidin B2
  - Flavonoli: dominira kamferol pentozid, zatim slijede kvercetin pentozid i kvercetin-3-rutinozid u podjednakim koncentracijama, te padajućem nizu kvercetin ramnozid, kamferol pentozil heksozid, kamferol ramnozil heksozid, kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-glukozid, kamferol-3-heksozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol ramnozid, isoramnetin-3-rutinozid i kvercetin acetil rutinozid, kamferol acetil rutinozid i miricetin
  - Luteolin je jedini predstavnik u skupini flavona.
- Vrsta nosača je određena kao ključan faktor za zadržavanje svih skupina spojeva u inkapsuliranim ekstraktima cvijeta trnine, dok temperatura i omjer nosača prema suhoj tvari ekstrakta nisu imali značajan utjecaj.
- Čisti MD bez dodatka GA i IN se pokazao kao optimalan nosač za inkapsulaciju većine promatranih spojeva, točnije UHCK, UFLO, UFLA i UPF, dok je za iste spojeve dodatak 25% GA u smjesu nosača imao neznatno slabiju učinkovitost s iznimkom UFL gdje je otkriven pozitivan utjecaj na ostvarenu koncentraciju. Iznimno je kod UBK utvrđen trend boljeg zadržavanja u ekstraktima inkapsuliranim s višim udjelom GA (MD+50%GA).
- Pri svim uvjetima sušenja, neovisno o vrsti nosača i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta, sastav fenolnih spojeva u PECT bio je isti. Najzastupljenija skupina fenolnih spojeva su

flavonoli (61%) i hidroksicimetne kiseline (35%), te u opadajućem nizu flavanoli, flavoni i hidroksibeznojeve kiseline.

- Antioksidacijski kapacitet inkapsuliranih ekstrakata je u skladu s koncentracijom ukupnih fenolnih spojeva bio značajno uvjetovan vrstom primijenjenog nosača pri čemu se najviše vrijednosti određene u ekstraktima inkapsuliranim čistim MD.
- Dodatak GA u smjese nosača je imao negativan utjecaj na antioksidacijski kapacitet inkapsuliranih ekstrakata bez negativnog utjecaja na sadržaj fenolnih spojeva, dok je dodatak IN pokazao negativan efekt i na koncentraciju fenolnih spojeva i na pripadajuću antioksidacijsku aktivnost.
- Optimizacijom inkapsulacijskih uvjeta s ciljem proizvodnje gotovog proizvoda s visokim stupnjem zadržavanja fenolnih spojeva i visokim antioksidacijskim kapacitetom utvrđeni su optimalni uvjeti za inkapsulaciju ekstrakta cvijeta trine sušenjem raspršivanjem: nosač MD, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 te temperatura sušenja 180°C.
- Pri utvrđenim optimalnim uvjetima inkapsulacije sušenjem raspršivanjem, postignut je vrlo visok udio zadržavanja fenolnih spojeva od 91,24% te njihov antioksidacijski kapacitet od 81,30% u usporedbi s početnim ekstraktom cvijeta trine.



## **6. LITERATURA**

- Abd El Kader, A. E., Abu Hashish, H. M. (2020) Encapsulation techniques of food bioproduct. *Egyptian Journal of Chemistry*. **63**(5), 1881–1909. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.16269.1993>
- Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T. M. (2020) Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *Journal of Clinical Medicine*. **9**(1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010109>
- Adamiec, J. (2009) Moisture Sorption Characteristics of Peppermint Oil Microencapsulated by Spray Drying. *Drying Technology*. **27**(12), 1363–1369. <https://doi.org/10.1080/07373930903383695>
- Adebooye, O. C., Alashi, A. M., Aluko, R. E. (2018) A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *Journal of Food Biochemistry*. **42**(4), 0–7. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12519>
- Adjé, F., Lozano, Y. F., Lozano, P., Adima, A., Chemat, F., Gaydou, E. M. (2010) Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products*. **32**(3), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.011>
- Afinjuomo, F., Abdella, S., Youssef, S. H., Song, Y., Garg, S. (2021) Inulin and its application in drug delivery. *Pharmaceuticals*. **14**(9). <https://doi.org/10.3390/ph14090855>
- Ajebli, M., Eddouks, M. (2020) Phytotherapy of hypertension: An updated overview. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. **20**(6), 812–839.
- Akbarbaglu, Z., Mahdi Jafari, S., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., Pezeshki, A. (2019) Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **178**(March), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.038>
- Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Dehnad, D. (2016) Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. **85**, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., Kwon, J-H (2017) Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science*

- and Food Safety*. **16**, 295–315. <https://doi.org/doi:10.1111/1541-4337.12253>
- Anand David, A. V., Arulmoli, R., Parasuraman, S. (2016) Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*. **10**(20), 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Armendáriz-Barragán, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodríguez, S. A., Kabbaj, D., Fessi, H., Elaissari, A. (2016) Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*. **13**(8), 1165–1175. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487>
- Ashour, M., W, F., Imran, M., Ghoneim, M., Alshehri, S., Shakeel, F. (2022) A Review on the Main Phytoconstituents, Traditional Uses, Inventions, and Patent Literature of Gum Arabic Emphasizing *Acacia seyal*. *Molecules*. **27**, 1171. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/molecules27041171>
- Augustin, M. A., Hemar, Y. (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*. **38**(4), 902–912. <https://doi.org/10.1039/b801739p>
- Ayaz Seyhan, S., Yilmaz, Z., Çikla Yilmaz, D. (2020) The influence of extraction method on antioxidant potential of *Tilia argentea* flowers and bracts. *Ovidius University Annals of Chemistry*. **31**(1), 14–17. <https://doi.org/10.2478/auoc-2020-0004>
- Bae, K., Park, J. H., Kim, J., Cho, C. K., Oh, B., Costa, D., ... Yoo, H. S. (2017) Traditional Oriental Herbal Medicine and Natural Killer Cells for Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Phytotherapy Research*. **31**(4), 519–532. <https://doi.org/10.1002/ptr.5781>
- Bakowska-Barczak, A. M., Kolodziejczyk, P. P. (2011) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*. **34**(2), 1301–1309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.002>
- Balasubramani, P., Viswanathan, R., Vairamani, M. (2013) Response surface optimisation of process variables for microencapsulation of garlic (*Allium sativum* L.) oleoresin by spray drying. *Biosystems Engineering*. **114**(3), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.12.008>
- Balta, V., Đikić, D., Crnić, I., Odeh, D., Oršolić, N., Kmetić, I., ... Jurčević, I. L. (2020) Effects of four-week intake of blackthorn flower extract on mice tissue antioxidant status and

- phenolic content. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. **70**(4), 361–375. <https://doi.org/10.31883/pjfns/128132>
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R. (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*. **120**(1), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R., Santos-Buelga, C. (2012) Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **50**(5), 1576–1582. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.004>
- Bartosz, T., Irene, T. (2019) Polyphenols encapsulation - application of innovation technologies to improve stability of natural products. *Physical Sciences Reviews*. **1**(2). <https://doi.org/10.1515/psr-2015-0005>
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hećimović, I., Ježek, D., Bauman, I. (2012) Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International*. **48**(2), 820–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.023>
- Bender, C., Graziano, S., Zimmermann, B. F. (2015) Study of *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activities and cellular properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **66**(5), 553–558. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1038223>
- Bernal-Millán, M. D. J., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Contreras-Angulo, L., Muy-Rangel, M. D., López-Martínez, L. X., Heredia, J. B. (2022) Spray-Dried Microencapsulation of Oregano (*Lippia graveolens*) Polyphenols with Maltodextrin Enhances Their Stability during In Vitro Digestion. *Journal of Chemistry*. **2022**. <https://doi.org/10.1155/2022/8740141>
- Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D. M. (2018) The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*. **23**(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
- Bindes, M. M. M., Reis, M. H. M., Cardoso, V. L., Boffito, D. C. (2019) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and *Moringa oleifera* seeds). *Ultrasonics Sonochemistry*. **51**(September 2018), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.014>

- Boo, Y. C. (2019) p-coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants*. **8**(8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080275>
- Both, S., Chemat, F., Strube, J. (2014) Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **21**(3), 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.005>
- Bouarab-Chibane, L., Ouled-Bouhedda, B., Leonard, L., Gemelas, L., Bouajila, J., Ferhout, H., ... Oulahal, N. (2017) Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*. **243**(11), 1997–2009. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2905-3>
- Braicu, C., Ladomery, M. R., Chedea, V. S., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. (2013) The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*. **141**(3), 3282–3289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.122>
- Brennan, J. G. (2006) Evaporation and Dehydration. In J. G. Brennan (Ed.), *Food Processing Handbook* (pp. 71–125). Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/3527607579.ch14>
- Bušić, A., Komes, D., Belščak-Cvitanovic, A., Cebin, A. V., Špoljarić, I., Mršić, G., Miao, S. (2018) The potential of combined emulsification and spray drying techniques for encapsulation of polyphenols from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Food Technology and Biotechnology*. **56**(4). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5680>
- Cal, K., Sollohub, K. (2010) Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **99**(2), 575–586. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Caleja, C., Barros, L., Barreira, J. C. M., Ciric, A., Sokovic, M., Calhelha, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2018) Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. *Food Chemistry*. **250**(September 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.034>
- Cegledi, E., Garofulić, I. E., Zorić, Z., Roje, M., Dragović-Uzelac, V. (2022) Effect of Spray Drying Encapsulation on Nettle Leaf Extract Powder Properties, Polyphenols and Their Bioavailability. *Foods*. **11**(18), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods11182852>
- Chen, X. Q., Hu, T., Han, Y., Huang, W., Yuan, H. B., Zhang, Y. T., ... Jiang, Y. W. (2016) Preventive effects of catechins on cardiovascular disease. *Molecules*. **21**(12), 1–7.

<https://doi.org/10.3390/molecules21121759>

- Choi, H. J., Song, J. H., Bhatt, L. R., Baek, S. H. (2010) Anti-human rhinovirus activity of gallic acid possessing antioxidant capacity. *Phytotherapy Research*. **24**(9), 1292–1296. <https://doi.org/10.1002/ptr.3101>
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003) Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(10), 2900–2911. <https://doi.org/10.1021/jf026187q>
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., Pellacani, C. (2016) Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/2986796>
- Dadi, D. W., Emire, S. A., Hagos, A. D., Eun, J. B. (2020) Physical and Functional Properties, Digestibility, and Storage Stability of Spray- and Freeze-Dried Microencapsulated Bioactive Products from *Moringa stenopetala* Leaves Extract. *Industrial Crops and Products*. **156**(August), 112891. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112891>
- De Souza Rosa, L., Jordão, N. A., Da Costa Pereira Soares, N., De Mesquita, J. F., Monteiro, M., Teodoro, A. J. (2018) Pharmacokinetic, antiproliferative and apoptotic effects of phenolic acids in human colon adenocarcinoma cells using in vitro and in silico approaches. *Molecules*. **23**(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102569>
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., Daglia, M. (2015) Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*. **99**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>
- Dikic, D., Balta, V., Kmetić, I., Murati, T., Orsolić, N., Dragović Uzelac, V., Landeka, I. (2018) Uplc / Ms Analysis of Plasma Bioavailability of 32 Polyphenols in C57Bl / 6 Mice Treated With Single Acute Dose ( 24 H ) of Flower Extract of the Blackthorn *Prunus*. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*. 23–31.
- Dobrinčić, A., Tuđen, L., Repajić, M., Garofulić, I. E., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., & Levaj, B. (2020) Microencapsulation of Olive Leaf Extract by Spray Drying. *Acta Alimentaria*. **49**(4), 475–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1556/066.2020.49.4.13>
- Dobrinčić, A., Repajic, M., Elez Garofulić, I., Tuđen, L., Dragović-Uzelac, V., Levaj, B. (2020) Comparison of Different Extraction Methods for the. *Processes*. **8**(9), 1008.

<https://doi.org/doi:10.3390/pr8091008>

- Dobrinčić, A., Tuden, L., Repajić, M., Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Levaj, B. (2020) Microencapsulation of olive leaf extract by spray drying. *Acta Alimentaria*. **49**(4), 475–482. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.4.13>
- Domokos, E., Csizmadia, B., Elekes, T., Kárp, A. K., Domokos, J. (2018) The characteristic medicinal plants of different vegetation types from the Niraj Valley, Romania. *Acta Biologica Marisiensis*. **1**(1), 10–17.
- Dong, F., Wang, X. (2018) Guar gum and ginseng extract coatings maintain the quality of sweet cherry. *Lwt*. **89**, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.035>
- Dragović-Uzelac, V., Levaj, B., Bursać, D., Pedisić, S., Radojčić, I., Biško, A. (2007) Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. **72**(4), 279–284.
- Drisya, M., Firoskhan, N. (2021) A review on natural antiviral herbal medicine. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **10**(3), 428–431. <https://doi.org/10.5958/2278-4853.2021.00856.9>
- Duletić-Laušević, S., Aradski, A. A., Živković, J., Gligorijević, N., Šavikin, K., Radulović, S., ... Marin, P. D. (2019) Evaluation of bioactivities and phenolic composition of extracts of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) collected in Montenegro. *Botanica Serbica*. **43**(1), 47–58. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB1901047D>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., ... Santini, A. (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. **33**(9), 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Kumar, V., Lather, V. (2005) Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian Journal of Pharmacology*,. **37**(3), 155.
- Ebrahimzadeh, M. A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saedi, M., Charati, J. Y. (2014) Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **13**(3), 1041–1048.
- Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., Czyzowska, A. (2021) Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **61**(1), 149–178.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović-Uzelac, V. (2018) UPLC-MS2 Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *Journal of Food Science*. **83**(11), 2782–2789. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14368>
- Elez Garofulic, I., Zoric, Z., Pedisic, S., Dragovic-Uzelac, V. (2016) Optimization of sour cherry juice spray drying as affected by carrier material and temperature. *Food Technology and Biotechnology*. **54**(4), 441–449. <https://doi.org/10.17113/ft.b.54.04.16.4601>
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2017) Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *LWT - Food Science and Technology*. **83**, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.017>
- Eng, Q. Y., Thanikachalam, P. V., Ramamurthy, S. (2018) Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. **210**, 296–310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.035>
- European Parliament & Council of the European Union (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic products. *Official Journal of the European Union*. **027**(13), 152–302. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32009R1223>
- Fang, J., Zhou, Q., Liu, L. Z., Xia, C., Hu, X., Shi, X., Jiang, B. H. (2007) Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression. *Carcinogenesis*. **28**(4), 858–864. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl205>
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., de Aguirre, J. M. (2012) Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*. **47**(6), 1237–1245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02964.x>
- Ferreira, M., Matos, A., Couras, A., Marto, J., Ribeiro, H. (2022) Overview of Cosmetic Regulatory Frameworks around the World. *Cosmetics*. **9**(4), 1–15.



<https://doi.org/10.3390/cosmetics9040072>

Forenbacher, S. (2001) *Velebit i njegov biljni svijet*. Zagreb: Školska knjiga.

Fowler Jr, J. F., Woolery-Lloyd, H., Waldorf, H., Saini, R. (2010) Innovations in natural ingredients and their use in skin care. *Journal of Drugs in Dermatology*. **9**(6S), 72–81.

Gadkari, P. V., Balaraman, M. (2015) Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*. **93**(August 2013), 122–138. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>

Gajic, I. S., Savic, I., Boskov, I., Žerajić, S., Markovic, I., Gajic, D. (2019) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from black locust (*Robinia pseudoacacia*) flowers and comparison with conventional methods. *Antioxidants*. **8**(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox8080248>

Garrett, A. R., Murray, B. K., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2010) Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. In *In Advanced protocols in oxidative stress II* (pp. 251–262). Humana Press, Totowa, NJ.

Garzón, G. A., Manns, D. C., Riedl, K., Schwartz, S. J., Padilla-Zakour, O. (2015) Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63**(6), 1803–1811. <https://doi.org/10.1021/jf503366c>

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. **40**(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Gillbro, J. M., Olsson, M. J. (2011) The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*. **33**(3), 210–221. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x>

Gonzalez, A. G., Irizar, A. C., Ravelo, A. G., Fernandez, M. F., Gonzalez, C. P. N. O. A., Universidad, I. D. B., ... Laguna, L. (1992) Type a Proanthocyanidins. **31**(4), 1432–1434.

Governa, P., Bains, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A. R., ... Biagi, M. (2018) Phytotherapy in the management of diabetes: A review. *Molecules*. **23**(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules23010105>

- Granza, A., Korczak, J., Amarowicz, R. (2005) Tea polyphenols - their antioxidant properties and biological activity - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. **14**(3), 219–235.
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Bucić-Kojić, A. (2020) Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*. **9**(10), 1–36. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
- Grimes, P., Nordlund, J. J., Pandya, A. G., Taylor, S., Rendon, M., Ortonne, J. P. (2006) Increasing our understanding of pigmentary disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **54**(5 SUPPL. 2), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.12.042>
- Gulcin, İ. (2020) *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview Archives of Toxicology* (Vol. 94). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gunjal, S. D. (2020) An Overview of Process Parameters and Spray drying agents involved in Spray drying of Herbal Extracts. **XIII**(Vii), 102–118.
- Gupta, R. D., Mahant, S. A., Wankhade, P. R., Hemke, A. T., Wadher, K. J., Umekar, M. J. (2021) Gallic Acid: A Versatile Molecule with Promising Pharmacological Effect. *International Journal of Pharmacognosy and Life Science*. **2**(1), 49–56. <https://doi.org/10.33545/27072827.2021.v2.i1a.27>
- Hertzog, D. I., Tica, O.-S. (2012) Molecular mechanisms underlying the anti- cancerous action of flavonoids. *Current Health Sciences Journal*. **38**(4), 145–149.
- Ho, H. H., Chang, C. Sen, Ho, W. C., Liao, S. Y., Lin, W. L., Wang, C. J. (2013) Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-κB activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **266**(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.019>
- Ho, L. P., Pham, A. H., Le, V. V. M. (2015) Effects of Core/Wall Ratio and Inlet Temperature on the Retention of Antioxidant Compounds during the Spray Drying of Sim (Rhodomyrtus tomentosa) Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*. **39**(6), 2088–2095. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12452>
- Hornig, C. T., Wu, H. C., Chiang, N. N., Lee, C. F., Huang, Y. S., Wang, H. Y., ... Chen, F. A. (2017) Inhibitory effect of burdock leaves on elastase and tyrosinase activity. *Experimental*

- and Therapeutic Medicine*. **14**(4), 3247–3252. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4880>
- Horžić, D., Jambrak, A. R., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Lelas, V. (2012) Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts. *Food and Bioprocess Technology*. **5**(7), 2858–2870. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0791-z>
- Hosseini, H., Jafari, S. M. (2020) Introducing nano/microencapsulated bioactive ingredients for extending the shelf-life of food products. *Advances in Colloid and Interface Science*. **282**, 102210. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102210>
- Hou, N., Liu, N., Han, J., Yan, Y., Li, J. (2017) Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*. **28**(1), 59–65. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000430>
- Huang, L., Jin, K., Lan, H. (2019) Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Oncology Letters*. **17**(4), 3842–3850. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10052>
- Huang, M. H., Tai, H. M., Wang, B. Sen, Chang, L. W. (2013) Inhibitory effects of water extract of Flos Inulae on mutation and tyrosinase. *Food Chemistry*. **139**(1–4), 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.066>
- Hulina, N. (2011) *Više biljke – stablašice, sistematika i gospodarsko značenje*. Zagreb: Golden marketing - Tehnička knjiga.
- Idžojić, M. (2013) *Dendrologija - Cvijet, češer, plod, sjeme*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet.
- Iida, K., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Kato, H., Nozaki, S., ... Takahashi, S. (2020) Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Science*. **111**(4), 1165–1179. <https://doi.org/10.1111/cas.14334>
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T. A., Saeed, F., Imran, A., ... Estevinho, L. M. (2019) Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24122277>
- Irizar, A. C., Fernandez, M. F., González, A. G., Ravelo, A. G., Ana Crespo Irizar, Margarita Fernandez Fernandez, Antonio G. González, and A. G. R. (1992) Constituents of Prunus

- spinosa. *Journal of Natural Products*. **55**(4), 450–454.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/np50082a008>
- Jaffe, R., Mani, J. (2018) *Polyphenolics Evoke Healing Responses: Clinical Evidence and Role of Predictive Biomarkers* (2nd ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Jo, S., Kim, S., Shin, D. H., Kim, M. S. (2020) Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **35**(1), 145–151.  
<https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>
- Jolayemi, O. S., Stranges, N., Flamminii, F., Casiraghi, E., Alamprese, C. (2021) Influence of Free and Encapsulated Olive Leaf Phenolic Extract on the Storage Stability of Single and Double Emulsion Salad Dressings. *Food and Bioprocess Technology*. **14**(1), 93–105.  
<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02574-y>
- Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., Bugarski, B. M. (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*. **179**, 369–380.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>
- Jovanovic, A., Petrovic, P., Đordjevic, V., Zdunic, G., Savikin, K., Bugarski, B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite Sirovine*. **37**(37), 45–49.  
<https://doi.org/10.5937/leksir1737045j>
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., Srawan, G. Y. (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*. **27**(3), 187–197.  
<https://doi.org/10.3109/02652040903131301>
- Kadota, K., Hashimoto, M., Yamaguchi, T., Kawachi, H., Uchiyama, H., Tozuka, Y. (2018) Preparation of a highly water-dispersible powder containing hydrophobic polyphenols derived from chrysanthemum flower with xanthine oxidaseinhibitory activity. *Food Science and Technology Research*. **24**(2), 273–281. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.273>
- Kaltsa, O., Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Bozinou, E., ... Makris, D. P. (2020) A green extraction process for polyphenols from elderberry (*Sambucus nigra*) flowers using deep eutectic solvent and ultrasound-assisted pretreatment. *Molecules*. **25**(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25040921>

- Kalyani Nair, K., Kharb, S., Thompkinson, D. K. (2010) Inulin dietary fiber with functional and health attributes - a review. *Food Reviews International*. **26**(2), 189–203. <https://doi.org/10.1080/87559121003590664>
- Karakas, N., Okur, M. E., Ozturk, I., Ayla, S., Karadag, A. E., Polat, D. Ç. (2019) Antioxidant activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extract and cytotoxic effects on various cancer cell lines. *Medeniyet Medical Journal*. **34**(3), 297–304. <https://doi.org/10.5222/MMJ.2019.87864>
- Kashyap, D., Sharma, A., Tuli, H. S., Sak, K., Punia, S., Mukherjee, T. K. (2017) Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. *Journal of Functional Foods*. **30**(January), 203–219. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.022>
- Kathiman, M. N., Mudalip, S. K. A., Gimbin, J. (2020) Effect of encapsulation agents on antioxidant activity and moisture content of spray dried powder from Mahkota Dewa fruit extract. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. **991**(1), 0–5. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012040>
- Kavaz Yuksel, A. (2015) The Effects of Blackthorn (*Prunus Spinosa*L.) Addition on Certain Quality Characteristics of Ice Cream. *Journal of Food Quality*. **38**(6), 413–421. <https://doi.org/10.1111/jfq.12170>
- Khadem, S., Marles, R. J. (2010) Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*. **15**(11), 7985–8005. <https://doi.org/10.3390/molecules15117985>
- Kiritsakis, K., Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., Gerasopoulos, D. (2018) Valorization of Olive Leaves: Spray Drying of Olive Leaf Extract. *Waste and Biomass Valorization*. **9**(4), 619–633. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0023-x>
- Kolodziej, H., Sakar, M. K., Burger, J. F. W., Engelshowe, R., Ferreira, D. (1991) A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry*. **30**(6), 2041–2047. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85064-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85064-7)
- Kong, C. S., Jeong, C. H., Choi, J. S., Kim, K. J., Jeong, J. W. (2013) Antiangiogenic effects of P-coumaric acid in human endothelial cells. *Phytotherapy Research*. **27**(3), 317–323. <https://doi.org/10.1002/ptr.4718>

- Laoué, J., Fernandez, C., Ormeño, E. (2022) Plant Flavonoids in Mediterranean Species: A Focus on Flavonols as Protective Metabolites under Climate Stress. *Plants*. **11**(2). <https://doi.org/10.3390/plants11020172>
- Lee, J. K. M., Taip, F. S., Abdulla, H. Z. (2018) Effectiveness of additives in spray drying performance: a review. *Food Research*. **2**(6), 486–499. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(6\).134](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(6).134)
- Levon, V., Golubkova, I. (2019) The Contents of Catechins and Anthocyanins in the Above-Ground Organs of Plants of *Prunus spinosa* L. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. 265–272. <https://doi.org/https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2019.2585-8246.265-272>
- Leyva-Jiménez, F. J., Lozano-Sánchez, J., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Fernández-Ochoa, Á., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2020) Spray-Drying Microencapsulation of Bioactive Compounds from Lemon Verbena Green Extract. *Foods*. **9**, 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods9111547>
- Lima, V. N., Oliveira-Tintino, C. D. M., Santos, E. S., Morais, L. P., Tintino, S. R., Freitas, T. S., ... Coutinho, H. D. M. (2016) Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*. **99**, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>
- Lin, X., Wang, G., Liu, P., Han, L., Wang, T., Chen, K., Gao, Y. (2021) Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **21**(6), 1–11. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10070>
- Liu, W., Nan, G., Nisar, M. F., Wan, C. (2020) Chemical Constituents and Health Benefits of Four Chinese Plum Species. *Journal of Food Quality*. **2020**. <https://doi.org/10.1155/2020/8842506>
- Lo Bosco, F., Guarrasi, V., Moschetti, M., Germanà, M. A., Butera, D., Corana, F., Papetti, A. (2019) Nutraceutical Value of Pantelleria Capers (*Capparis spinosa* L.). *Journal of Food Science*. **84**(8), 2337–2346. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14718>
- Looi, Y. F., Ong, S. P., Julkifle, A., Alias, M. S. (2019) Effects of pretreatment and spray drying on the physicochemical properties and probiotics viability of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaf juice powder. *Journal of Food Processing and Preservation*. **43**(4), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13915>

- López-Fernández, O., Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Lorenzo, J. M. (2020) Determination of polyphenols using liquid chromatography–tandem mass spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants*. **9**(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>
- López Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2013) Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers*. **95**(1), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.019>
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., Alves, V. D. (2020) Microencapsulation of pineapple peel extract by spray drying using maltodextrin, inulin, and Arabic gum as wall matrices. *Foods*. **9**(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060718>
- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V., Kovačević, D. B., ... Dragović-Uzelac, V. (2017) The Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technology and Biotechnology*. **55**(2), 243–250. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4687>
- Makarova, K., Sajkowska-Kozielewicz, J. J., Zawada, K., Olchowik-Grabarek, E., Ciach, M. A., Gogolewski, K., ... Gambin, A. (2021) Harvest time affects antioxidant capacity, total polyphenol and flavonoid content of Polish St John's wort's (*Hypericum perforatum* L.) flowers. *Scientific Reports*. **11**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83409-4>
- Mali Snehal, D., Khochage Swapna, R., Nitalikar Manoj, M., Magdum Chandrakant, S. (2013) Microencapsulation: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. **6**(9), 954–961.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M. A. (2017) Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Frontiers in Pharmacology*. **8**(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00680>
- Marchelak, A., Owczarek, A., Rutkowska, M., Michel, P., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M. A. (2019) New insights into antioxidant activity of *Prunus spinosa* flowers: Extracts, model polyphenols and their phenolic metabolites in plasma towards multiple in vivo-relevant oxidants. *Phytochemistry Letters*. **30**. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.011>

- Marino, T., Galano, A., Russo, N. (2014) Radical scavenging ability of gallic acid toward OH and OOH radicals-reaction mechanism and rate constants from the density functional theory. *Journal of Physical Chemistry B*. **118**(35), 10380–10389. <https://doi.org/10.1021/jp505589b>
- Martinić, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Cebin, A. V., Karlović, S., ... Komes, D. (2022) Microencapsulation of Dandelion (*Taraxacum officinale* L.) Leaf Extract by Spray Drying. *Food Technology and Biotechnology*. **60**(2), 237–252. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7384>
- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., Ferreira, I. C. F. R. (2014) Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: Characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food and Function*. **5**(6), 1091–1100. <https://doi.org/10.1039/c3fo60721f>
- Matejczyk, M., Świsłocka, R., Golonko, A., Lewandowski, W., Hawrylik, E. (2018) Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*. **63**(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.07.003>
- Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ... Manero, O. (2016) Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products*. **90**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.009>
- Meyer, D., Bayarri, S., Tárrega, A., Costell, E. (2011) Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*. **25**(8), 1881–1890. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.012>
- Michalska, A., Wojdyło, A., Brzezowska, J., Majerska, J., Ciska, E. (2019) The influence of inulin on the retention of polyphenolic compounds during the drying of blackcurrant juice. *Molecules*. **24**(22). <https://doi.org/10.3390/molecules24224167>
- Miller, N. J., Begoña Ruiz-Larrea, M. (2002) Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*. **12**(1), 39–51. <https://doi.org/10.1080/13590840220123352>
- Mishra, P., Mishra, S., Mahanta, C. L. (2014) Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla



- (*Emblca officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*. **92**(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.003>
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., Udenigwe, C. C. (2015) Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *RSC Advances*. **5**(97), 79270–79278. <https://doi.org/10.1039/c5ra13419f>
- Morais, R. M. S. C., Morais, A. M. M. B., Dammak, I., Bonilla, J., Sobral, P. J. A., Laguerre, J.-C., ... Ramalhosa, E. C. D. (2018) Functional Dehydrated Foods for Health Preservation. *Journal of Food Quality*. **2018**, 1–29. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2018/1739636>
- Moreira, X., Castagneyrol, B., Abdala-Roberts, L., Berny-Mier y Teran, J.C., Timmermans, B.G.H., Bruun, H.H., Covelo, F., Glauser, G., Rasmann, S. and Tack, A. J. M. (2018) Latitudinal variation in plant chemical defences drives latitudinal patterns of leaf herbivory. *Ecography*. **41**(Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/jav.00934), 1124-1134. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/ecog.03326>
- Mujumdar, A. S. (2001) Recent developments in the drying technologies for the production of particulate materials . In A. Levy & H. Kalman (Eds.), *Handbook of Powder Technology* (pp. 533–545). Elsevier Science B.V. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0167-3785\(01\)80056-7](https://doi.org/10.1016/S0167-3785(01)80056-7)
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Murati, T., Miletić, M., Štefanko, A., Landeka Jurčević, I., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Kmetič, I. (2019) Comparative assessment of *Prunus spinosa* L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *South African Journal of Botany*. **123**, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.02.006>
- Murugesan, R., Orsat, V. (2012) Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients- A Review. *Food and Bioprocess Technology*. **5**(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0638-z>
- Muzaffar, K., Nayik, G. A., Kumar, P. (2015) Stickiness Problem Associated with Spray Drying of Sugar and Acid Rich Foods: A Mini Review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. **s12**(August), 10–13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.s12-003>

National Center for Biotechnology Information (2022a) PubChem Compound Summary for CID 107905, (-)-Epicatechin gallate. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epicatechin-gallate>

National Center for Biotechnology Information (2022b) PubChem Compound Summary for CID 370, Gallic acid. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid>.

National Center for Biotechnology Information (2022c) PubChem Compound Summary for CID 5089889, Procyanidin A1. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procyanidin-A1>

National Center for Biotechnology Information (2022d) PubChem Compound Summary for CID 5280343, Quercetin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>.

National Center for Biotechnology Information (2022e) PubChem Compound Summary for CID 5280443, Apigenin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apigenin>

National Center for Biotechnology Information (2022f) PubChem Compound Summary for CID 5280445, Luteolin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>

National Center for Biotechnology Information (2022g) PubChem Compound Summary for CID 5280863, Kaempferol. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>.

National Center for Biotechnology Information (2022h) PubChem Compound Summary for CID 68229136, Maltodextrin-dextrose equivalent 10-15. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maltodextrin-dextrose-equivalent-10-15>

National Center for Biotechnology Information (2022i) PubChem Compound Summary for CID 689043, Caffeic acid. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>.

National Center for Biotechnology Information (2022j) PubChem Compound Summary for CID 72276, (-)-Epicatechin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epicatechin>.

- National Center for Biotechnology Information (2022k) PubChem Compound Summary for CID 9064, Cianidanol. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cianidanol>
- Navarro-Flores, M. J., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R., Abud-Archila, M. (2020) Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *Journal of Food Science and Technology*. **57**(11), 4111–4122. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w>
- Nirmal, N. P., Benjakul, S. (2011) Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *Lwt*. **44**(4), 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.007>
- Oliveira, W. P., Souza, C. R. F., Kurozawa, L. E., Park, K. J. (2010) Spray drying of food and herbal products. In *Spray Drying Technology* (1st ed., pp. 113–156). Singapore.
- Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbiś, M., Bald, E. (2001a) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **58**(3), 199–203.
- Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbiś, M., Bald, E. (2001b) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **58**(3), 199–203.
- Olszewska, M., Wolbiś, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **58**(5).
- Olszewska, Monika, Wolbiś, M. (2000) Phenolic acids in flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Herba Polonica*. **46**(4).
- Olszewska, Monika, Wolbiś, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **59**(2), 133–137.
- Osamede Airouyuwa, J., Kaewmanee, T. (2019) Microencapsulation of *Moringa oleifera* leaf extracts with vegetable protein as wall materials. *Food Science and Technology International*. **25**(6), 533–543. <https://doi.org/10.1177/1082013219842469>
- Osorio-Tobón, J. F. (2020) Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*.

- 57(12), 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Oulahal, N., Degraeve, P. (2022) Phenolic-Rich Plant Extracts With Antimicrobial Activity: An Alternative to Food Preservatives and Biocides? *Frontiers in Microbiology*. **12**(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753518>
- Özcan, T., Bayçu, G. (2008) Fatty acid and amino acid profiles in the fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in- Turkey. (1), 39–46.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A. (2018) Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. **66**(1), 25–31. <https://doi.org/10.1111/lam.12814>
- Pacheco, C., González, E., Robert, P., Parada, J. (2018) Retention and pre-colon bioaccessibility of oleuropein in starchy food matrices, and the effect of microencapsulation by using inulin. *Journal of Functional Foods*. **41**(December 2017), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.037>
- Pagliarulo, C., Sansone, F., Moccia, S., Russo, G. L., Aquino, R. P., Salvatore, P., ... Volpe, M. G. (2016) Preservation of Strawberries with an Antifungal Edible Coating Using Peony Extracts in Chitosan. *Food and Bioprocess Technology*. **9**(11), 1951–1960. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1779-x>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. **5**. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pasrija, D., Ezhilarasi, P. N., Indrani, D., Anandharamakrishnan, C. (2015) Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *Lwt*. **64**(1), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.054>
- Pieczykolan, E., Kurek, M. A. (2019) Use of guar gum, gum arabic, pectin, beta-glucan and inulin for microencapsulation of anthocyanins from chokeberry. *International Journal of Biological Macromolecules*. **129**, 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.073>
- Pinheiro, P. F., Justino, G. C. (2012) Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. In *Phytochemicals - a Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health* (pp. 33–56).

- <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/1387>.
- Poonam, V., Raunak, Kumar, G., S. Reddy L., C., Jain, R., K. Sharma, S., ... S. Parmar, V. (2012) Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and their Medicinal Properties. *Current Medicinal Chemistry*. **18**(25), 3758–3824. <https://doi.org/10.2174/092986711803414386>
- Poozesh, S., Bilgili, E. (2019) Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. **562**(March), 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.047>
- Popescu I, C. G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In A. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri (Ed.), *European Atlas of Forest Tree Species* (p. 2016). Publ. Off. EU, Luxembourg. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/299471144\\_Prunus\\_spinosa\\_in\\_Europe\\_distribution\\_habitat\\_usage\\_and\\_threats](https://www.researchgate.net/publication/299471144_Prunus_spinosa_in_Europe_distribution_habitat_usage_and_threats)
- Poshadri, A., Kuna, A. (2010) Microencapsulation technology: a review. *J.Res. ANGRAU*. **38**(1), 86–102.
- Prior, R. L. (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*. **18**, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Racoviță, Ș., Vasiliu, S., Popa, M., Luca, C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*. **54**(9), 709–718.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S. M., Sadeghi Mahoonak, A., Rajabzadeh, G. (2015) Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*. **51**, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.033>
- Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., Orrego, C. E. (2015) Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technology*. **277**, 89–96.

<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.060>

- Rasouli, H., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*. **20**(2), 1700–1741. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>
- Rejniak JM, R. Z. (2014) Potential antiradical activity of *Prunus spinosa* extracts. In S.-K. R (Ed.), *Commodity Science in Research and Practice – Non-food products' quality and innovations* (pp. 139–150). Cracow: Polish Society of Commodity Science.
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., Rocha, F. (2019) Spray Drying Encapsulation of Elderberry Extract and Evaluating the Release and Stability of Phenolic Compounds in Encapsulated Powders. *Food and Bioprocess Technology*. **12**(8), 1381–1394. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02304-z>
- Ribeiro, A. S., Estanqueiro, M., Oliveira, M. B., Lobo, J. M. S. (2015) Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics*. **2**(2), 48–65. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2020048>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. **2**(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Righi da Rosa, J., Cezimbra Weis, G. C., Bolson Moro, K. I., Sasso Robalo, S., Elias Assmann, C., Picolli da Silva, L., ... Severo da Rosa, C. (2021) Effect of wall materials and storage temperature on anthocyanin stability of microencapsulated blueberry extract. *Lwt*. **142**(September 2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111027>
- Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., Santos, J. (2012) Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*. **134**(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.019>
- Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., ... Lucini, L. (2022) Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **21**(2), 811–842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>
- Şahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., özdemir, F. (2013) Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa*)

- Miller) by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. **52**(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.007>
- Sakar, M. K., Kolodziej, H. (1993) Flavonoid glycosides from the flowers of *Prunus spinosa*. *Fitoterapia*. **64**(2).
- Salehi, B., Machin, L., Monzote, L., Sharifi-Rad, J., Ezzat, S. M., Salem, M. A., ... Cho, W. C. (2020) Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*. **5**(20). <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>
- Samantha, S. C., Bruna, A. S. M., Adriana, R. M., Fabio, B., Sandro, A. R., Aline, R. C. A. (2015) Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. *African Journal of Food Science*. **9**(9), 462–470. <https://doi.org/10.5897/ajfs2015.1279>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ... Bernad-Bernad, M. J. (2015) Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT - Food Science and Technology*. **64**(2), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.020>
- Santos, D., Maurício, A. C., Sencadas, V., Santos, J. D., Fernandez, Maria H. Gomes, P. S. (2017) Spray Drying: An Overview. In *Biomaterials - Physics and Chemistry* (p. 13). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72247>
- Sari, C., Sümer, C., Celep Eyüpoğlu, F. (2020) Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis in colorectal cancer cells via inhibition of survivin. *Turkish Journal of Biology*. **44**(5), 264–274. <https://doi.org/10.3906/biy-2003-18>
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J. (2010) Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*. **131**(1), 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.061>
- Sawale, P. D., Patil, G. R., Hussain, S. A., Singh, A. K., Singh, R. R. B. (2017) Effect of incorporation of encapsulated and free Arjuna herb on storage stability of chocolate vanilla dairy drink. *Food Bioscience*. **19**(October 2016), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.005>

- Saxena, A., Sharma, L., Maity, T. (2020) *Enrichment of edible coatings and films with plant extracts or essential oils for the preservation of fruits and vegetables Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00034-5>
- Schwabes, W. (1924) *Homöopathisches Arzneibuch* (2nd ed.). Leipzig: Verlag dr. Willimar Scwabe.
- Sepahvand, A., Ezatpour, B., Tarkhan, F., Bahmani, M., Khonsari, A., Rafieian-Kopae, M. (2017) Phytotherapy in fungi and fungal disease: A review of effective medicinal plants on important fungal strains and diseases. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **8**(11), 4473–4495. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(11\).4473-95](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(11).4473-95)
- Shabani, S., Rabiei, Z., Amini-Khoei, H. (2020) Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review. *International Journal of Food Properties*. **23**(1), 736–752. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1753769>
- Shao, P., Xuan, S., Wu, W., Qu, L. (2019) Encapsulation efficiency and controlled release of *Ganoderma lucidum* polysaccharide microcapsules by spray drying using different combinations of wall materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. **125**, 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.153>
- Shukla, S., Gupta, S. (2010) Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res*. **27**(6), 962–978. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0089-7>.
- Sikora, E., Bieniek, M. I., Barbara, B. (2013) Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. **12**(4), 365–372.
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., ... Al-Hiary, M. (2019) Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*. **102**(5), 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
- Siripatrawan, U., Harte, B. R. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. **24**(8), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>



- Sivakumar, T., Sivakumar, D. T. (2022) A systematic review on traditional medicinal plants used for traditional control of insects. (December), 31–36.
- Skroza, D., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V., Boban, N., Generalić Mekinić, I. (2019) Interactions of resveratrol with other phenolics and activity against food-borne pathogens. *Food Science and Nutrition*. **7**(7), 2312–2318. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1073>
- Sönmez, M., Önder F C, Tokay, E., Çelik A, F, K., Ay, M. (2021) Investigation of antioxidant, enzyme inhibition and antiproliferative activities of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) extracts. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. **4**(3), 360–380. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.851220>
- Ștefănescu, B. E., Nemes, S. A., Teleky, B. E., Călinoiu, L. F., Mitrea, L., Martău, G. A., ... Crișan, G. (2022) Microencapsulation and Bioaccessibility of Phenolic Compounds of Vaccinium Leaf Extracts. *Antioxidants*. **11**(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox11040674>
- Stefova, M., Kulevanova, S., Stafilov, T. (2001) Assay of flavonols and quantification of quercetin in medicinal plants by HPLC with UV-diode array detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **24**(15), 2283–2292. <https://doi.org/10.1081/JLC-100105140>
- Strothmann, A. L., Berne, M. E. A., de Almeida Capella, G., de Moura, M. Q., da Silva Terto, W. D., da Costa, C. M., Pinheiro, N. B. (2022) Antiparasitic treatment using herbs and spices: A review of the literature of the phytotherapy. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*. **44**, 1–11. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm004722>
- Suganya, V., Anuradha, V. (2017) Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **9**(3), 233–239. <https://doi.org/10.25258/ijpcr.v9i3.8324>
- Šugar, I., Gostl, I., Hazler-Pilepić, K. (2002) *Hrvatsko biljno nazivlje: analiza hrvatskog biljnog nazivlja u djelu Liber de simplicibus Benedicti Rinij.*. Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada.
- Susantikarn, P., Donlao, N. (2016) Optimization of green tea extracts spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Food Research Journal*. **23**(3), 1327–1331.

- Suyalek, S., Jaturonglumert, S., Amornlerdpison, D., Narkprasom, N., Narkprasom, K. (2020) Encapsulation of crude extracts from Banana (*Musa X paradisca*) flowers by Spray Drying. *Burapha Science Journal*. **25**((2)), 448-463.
- Tchabo, W., Ma, Y., Kaptso, G. K., Kwaw, E., Chen, R. W., Xiao, L., ... Farooq, M. (2019) Process Analysis of Mulberry (*Morus alba*) Leaf Extract Encapsulation: Effects of Spray Drying Conditions on Bioactive Encapsulated Powder Quality. *Food and Bioprocess Technology*. **12**(1), 122–146. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2194-2>
- Tengse, D. D., Priya, B., Kumar, P. A. R. (2017) Optimization for encapsulation of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract by spray drying technology. *Journal of Food Measurement and Characterization*. **11**(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9374-4>
- Tesfay, S. Z., Magwaza, L. S. (2017) Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*. **11**, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.12.001>
- Tkacz, K., Wojdyło, A., Michalska-Ciechanowska, A., Turkiewicz, I. P., Lech, K., Nowicka, P. (2020) Influence Carrier Agents, Drying Methods, Storage Time on Physico-Chemical Properties and Bioactive Potential of Encapsulated Sea Buckthorn Juice Powders. *Molecules*. **25**(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173801>
- Tomsone, L., Galoburda, Ruta, Kruma, Z., Durrieu, V., Ingmars, C. (2020) Microencapsulation of Horseradish (*Armoracia rusticana* L.) Juice Using Spray-Drying. *Foods*. **9**(9), 1–17. <https://doi.org/doi:10.3390/foods9091332>
- Tong, X., Pelling, J. (2013) Targeting the PI3K/Akt/mTOR Axis by Apigenin for Cancer Prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **13**(7), 971–978. <https://doi.org/10.2174/18715206113139990119>
- Tran, T. T. A., Nguyen, H. V. H. (2018) Effects of Spray-Drying Temperatures and Carriers on Physical and Antioxidant Properties of Lemongrass Leaf Extract Powder. *Beverages*. **4**(84), 1–14. <https://doi.org/10.3390/beverages4040084>
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. **2**(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tuan, P. M., Anh, H. T. Van, Cam, L. T. H., Chi, V. N. Q., Oanh, D. T. B., Khue, D. B., ...

- Nghia, T. T. (2016) Extraction and Encapsulation of Polyphenols From Guava Leaves. *Annals: Food Science & Technology*. **17**(1).
- Turkiewicz, I. P., Wojdyło, A., Tkacz, K., Lech, K., Michalska-Ciechanowska, A., Nowicka, P. (2020) The influence of different carrier agents and drying techniques on physical and chemical characterization of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) microencapsulation powder. *Food Chemistry*. **323**(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126830>
- Urzúa, C., González, E., Dueik, V., Bouchon, P., Giménez, B., Robert, P. (2017) Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. *Food and Bioproducts Processing*. **106**, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.001>
- Vandamme, T., Poncelet, D., Subra-Paternault, P. (2007) *Microencapsulation : des sciences aux technologies* (2nd ed.). Editions Tec & Doc.
- Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., Popović, L. M. (2014) Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*. **258**, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.038>
- Visioli, F., de la Lastra, C. A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., ... Edeas, M. (2011) Polyphenols and human health: A prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51**(6), 524–546. <https://doi.org/10.1080/10408391003698677>
- Wagner, H., Bladt, S. (1996) *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Wang, J., Li, H., Chen, Z., Liu, W., Chen, H. (2016) Characterization and storage properties of a new microencapsulation of tea polyphenols. *Industrial Crops and Products*. **89**, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.013>
- Wikimedia Commons (2006) Otto Wilhelm Thome (1885) - Ilustracija cvijeta, ploda, sjemenke i lišća trnina. Retrieved from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration\\_Prunus\\_spinosa0.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Prunus_spinosa0.jpg)
- Wolbiś, M., Olszewska, M., Wesolowski, W. J. (2001) Triterpenes and sterols in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. (rosaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **58**(6).
- Wu, L., Chen, C., Cheng, C., Dai, H., Ai, Y., Lin, C., Chung, Y. (2018) Evaluation of

- Tyrosinase Inhibitory, Antioxidant, Antimicrobial, and Antiaging Activities of *Magnolia officinalis* Extracts after *Aspergillus Niger* Fermentation. *BioMed Research International*. **2018**(1). <https://doi.org/10.1155/2018/5201786>
- Wyganowska-Swiatkowska, M., Nohawica, M., Grocholewicz, K., Nowak, G. (2020) Influence of herbal medicines on hmgb1 release, sars-cov-2 viral attachment, acute respiratory failure, and sepsis. A literature review. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(13), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms21134639>
- Xiao, Z., Xia, J., Zhao, Q., Niu, Y., Zhao, D. (2022) Maltodextrin as wall material for microcapsules: A review. *Carbohydrate Polymers*. **298**(June), 120113. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120113>
- Yang, G., Yue, J., Gong, X., Qian, B., Wang, H., Deng, Y., Zhao, Y. (2014) Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries. *Postharvest Biology and Technology*. **92**, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.018>
- Yeop, A., Sandanasamy, J., Pang, S. F., Gim bun, J. (2021) Stability and controlled release enhancement of *Labisia pumila*'s polyphenols. *Food Bioscience*. **41**(April 2020), 101025. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101025>
- Zhang, J., Zhang, C., Chen, X., Quek, S. Y. (2020) Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. *Journal of Food Engineering*. **269**, 109744. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109744>
- Zhao, J. (2008) Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. *Recent Patents on Biotechnology*. **1**(1), 75–97. <https://doi.org/10.2174/187220807779813893>
- Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Kersch, M. (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*. **37**(5), 455–464. <https://doi.org/10.1111/ics.12218>
- Zokti, J. A., Baharin, B. S., Mohammed, A. S., Abas, F. (2016) Green tea leaves extract: Microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules*. **21**(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules21080940>

Zuidam, N. J., Shimoni, E. (2010) Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3–29). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_2)

## ŽIVOTOPIS DOKTORANDA

**Nikolina Gaćina** rođena je 15. travnja 1974. u Šibeniku gdje je stekla osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje u Medicinskoj školi Šibenik, smjer laborantski tehničar. 1992. godine je upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet, smjer biokemijsko inženjerstvo gdje je diplomirala 2001. godine, s izvrsnim prosjekom.

Diplomski rad naziva „Obrada vode reverznom osmozom“ je odradila pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivana Mijatovića u Laboratoriju za tehnologiju vode, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2003. godine zaposlena je kao asistent na Visokoj školi za turizam u Šibeniku (danas Veleučilište u Šibeniku), te sudjeluje na nastavi na kolegija *Tehnologija hrane i pića*, *Praksa u turizmu* i *Mentorska praksa* na preddiplomskom stručnom studiju Menadžment, smjer turistički menadžment i na preddiplomskom stručnom studiju Promet na kolegiju *Poznavanje robe*. Od 2009. godine bira se u nastavno zvanje predavača te preuzima nositeljstvo kolegija *Tehnologija hrane i pića* i *Poznavanje robe*, te uvodi novi kolegij na specijalističkom diplomskom stručnom studiju Menadžment *Prehrana u turizmu*. Od 2013. godine postaje viši predavač, te u periodu od 2013.-2014. godine obnaša funkciju Prodekana za nastavu Veleučilišta u Šibeniku. Od 2019. godine osim nastavnih aktivnosti prethodno navedenih kolegija postaje pročelnik Odjela Menadžment Veleučilišta u Šibeniku (mandat od 4 godine) i preuzima kolegij *Upotreba DDD i HACCP u hotelijerstvu* također na preddiplomskom stručnom studiju Menadžment, smjer turistički menadžment. U akademskoj godini 2020/2021 uvodi novi kolegij *Sigurnost hrane u turizmu* na preddiplomskom stručnom studiju turistički menadžment, te izvodi nastavu na engleskom jeziku za ERASMUS studente.

Od 2016.-2019. godine bila je suradnik na međunarodnom projektu „*Shaping the Future Education in Tourism*“, za izradu intelektualnih rezultata 01 „*National Menu*“, unutar KA203 aktivnosti programa Erasmus+ između Nacionalne agencije za europske obrazovne programe u Makedoniji i „Goce Delčev“ Sveučilišta Štip Makedonija i Veleučilišta u Šibeniku.

Od 2021.-2023. godine je vanjski suradnik za provedbu edukacija i izradu edukativnih materijala (na području Šibensko-Kninske županije) na projektu HEPSC *Heathy Eating Prescholl Children* kojeg provodi JZU Doma zdravlja Bar, s partnerima ZZJZ Šibensko-kninske županije, ZZJZ Federacije Bosne i Hercegovine i Ministarstvo rada, zdravstva, socijalne skrbi i

prognanih Hercegbosanske Županije. Projekt je sufinanciran sredstvima EFRR i IPA II fondovima Europske unije.

Do sad je objavila jedan a1 rad iz područja nutricionizma i šest a3 rada. Sudjelovala je na 18 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova.

**POPIS ZNANSTVENIH RADOVA****A1**

- Gaćina, N., Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2022, 28. studeni) Influence of Encapsulation Parameters on the Retention of Polyphenols in Blackthorn Flower Extract. *Processes*, 10, 12; 2517, 13. doi:10.3390/pr10122517. IF=3.352 (Q2)

**A3**

- Gaćina, N., Vučak, J.(2022) Važnost dijetoterapije u liječenju fenilketonurije: prikaz slučaja. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, 16 (3-4), 145-152. doi:10.51650/ezrvs.16.3-4.7. ERIH; CAB Abstract (CABI); DOAJ; Cite Factor; SIS; Hrčak; Google Scholar.
- Brkić, E., Gaćina, N. (2018) *Stevia rebaudiana* Bertoni - prirodni funkcionalni zaslađivač. *Glasilo Future*, 1 (1-2) 39-47. doi:10.32779/gf.1.1-2.4. CAB ABSTRACTS (CAB INTERNATIONAL); GLOBAL HEALTH.
- Devčić, K., Beljo, I., Gaćina, N. (2017) Minimization of the diet costs on the three-day menu example. *International Journal Vallis Aurea*, 3 (1) 15-24. doi:10.2507/IJVA.3.1.2.33. EBSCOhost; Index Copernicus; CEEOL; ERIH PLUS; Hrčak; CEJSH; DOAJ; HeinOnline Law Journal Library
- Staničić, N., Gaćina, N. (2016) Prehrana i religija: halal turizam. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, 1/2, 73-85. (<https://www.bib.irb.hr/957240>) ERIH; CAB Abstract (CABI); DOAJ; Cite Factor; SIS; Hrčak; Google Scholar.
- Vlahov, A., Gaćina, N. (2016) Hrvatski otoci i otočni proizvodi. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, 3-4, 95-102. (<https://www.bib.irb.hr/957247>) ERIH; CAB Abstract (CABI); DOAJ; Cite Factor; SIS; Hrčak; Google Scholar.
- Gaćina, N. (2015) Hormonalne molekule probavnog sustava i regulacija apetita. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, 1-2, 185-192. (<https://www.bib.irb.hr/957242>) ERIH; CAB Abstract (CABI); DOAJ; Cite Factor; SIS; Hrčak; Google Scholar.