Utjecaj metoda obrade na biološku aktivnost i in vitro gastrointestinalnu stabilnost fenola iz kultivirane borovnice (Vaccinium corymbosum L.)

Liović, Nikolina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:159:463417

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Nikolina Liović

UTJECAJ METODA OBRADE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST FENOLA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Nikolina Liović

INFLUENCE OF DIFFERENT PROCESSING METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITIES AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF PHENOLICS FROM CULTIVATED BLUEBERRIES (*Vaccinium corymbosum* L.)

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Nikolina Liović

UTJECAJ METODA OBRADE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST FENOLA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

DOKTORSKI RAD

Mentorice:

Prof. dr.sc. Tea Bilušić

Prof. dr.sc. Greta Krešić

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Nikolina Liović

INFLUENCE OF DIFFERENT PROCESSING METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITIES AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF PHENOLICS FROM CULTIVATED BLUEBERRIES (*Vaccinium corymbosum* L.)

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

PhD Tea Bilušić, Full Professor

PhD Greta Krešić, Full Professor

Zagreb, 2019.

Željela bih se zahvaliti svima koji su mi pomogli i bili podrška u realizaciji ovog doktorskog rada.

Na prvom mjestu neizmjerno sam zahvalna mojim mentoricama prof. dr. sc. Tei Bilušić i prof. dr. sc. Greti Krešić na pomoći pri oblikovanju ovog istraživanja, savjetima i podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada. Prof. dr. sc. Tei Bilušić veliko hvala što mi je omogućila i pomogla u izvođenju eksperimentalnog dijela istraživanja na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu.

Zahvalu upućujem prof. dr. sc Verici Dragović-Uzelac te djelatnicima Centra za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru, doc. dr. sc. Zoranu Zoriću i doc. dr. sc. Sandri Pedisić, što su mi omogućili HPLC analizu uzoraka.

Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak veliko hvala na pomoći tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada, obrade uzoraka ultrazvukom visokog intenziteta, u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Zahvale upućujem i doc. dr. sc. Jošku Markiću, dr. med., na osiguranim uzorcima humanih probavnih enzima koji su bili neophodni za provođenje ovog istraživanja.

Izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić zahvaljujem na pomoći tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada, određivanje antiproliferacijske aktivnosti uzoraka, na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Veliko hvala doc. dr. sc. Perici Boškoviću s Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Splitu i dr. sc. Ivani Drvenici s Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu na pomoći tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada, inkapsulacije uzoraka u mikroemulzije i liposome.

Zahvaljujem članovima Zavoda za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, a posebno Miji Grgi, dipl. ing. na savjetima i pruženoj pomoći pri radu u laboratoriju.

Najveću zahvalnost ipak dugujem Marku na neizmjernoj podršci tijekom proteklih nekoliko godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Nutricionizam

UDK: 534-8:547.56:582.688.31:637.133.3(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

UTJECAJ METODA OBRADE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST FENOLA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

Nikolina Liović, mag. nutr.

Rad je izrađen na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
Mentorice: Prof. dr. sc. Tea Bilušić
Prof. dr. sc. Greta Krešić

Kratki sažetak

U ovom radu istražen je utjecaj liofilizacije, pasterizacije i ultrazvuka visokog intenziteta na biološku aktivnost i *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost fenolnih spojeva kultivirane borovnice. Učinak primijenjenih metoda obrade kultivirane borovnice ispitan je na: fenolni profil, antioksidacijsku aktivnost, aktivnost enzima polifenol oksidaze te stabilnost i biološku aktivnost fenolnih spojeva nakon simulirane *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu primjenom humanih probavnih enzima. Dodatno je ispitan učinak inkapsulacije ekstrakata borovnice na produženje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je liofilizacija učinkovita metoda za očuvanje fenolnih spojeva borovnice i njihove antioksidacijske aktivnosti kao i za smanjenje aktivnosti enzima polifenol oksidaze. Rezultati nakon provedene *in vitro* probave pokazali su da primjena postupka liofilizacije i ultrazvuka visokog intenziteta mogu osigurati bolju gastrointestinalnu stabilnost fenolnih spojeva borovnice. Inkapsulirani ekstrakti borovnice značajno su produljili oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, a inkapsulacija u mikroemulzije imala je bolji učinak u odnosu na ekstrakte inkapsulirane u liposome.

Broj stranica: 165
Broj slika: 33
Broj tablica: 45
Broj literaturnih navoda: 268
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost; antiproliferacijska aktivnost; borovnica; fenolni spojevi; *in vitro* probava; inkapsulacija; liofilizacija; pasterizacija; polifenol oksidaza; ultrazvuk visokog intenziteta

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. **Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac**
2. **Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak**
3. **Prof. dr. sc. Daniela Čačić Kenjerić**
4. **Doc. dr. sc. Sandra Pedisić**

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 **Doctoral Thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Nutrition

UDK: 534-8:547.56:582.688.31:637.133.3(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Science
Scientific Field: Nutrition

INFLUENCE OF DIFFERENT PROCESSING METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITIES AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF PHENOLICS FROM CULTIVATED BLUEBERRIES (*Vaccinium corymbosum* L.)

Nikolina Liović, MA

Thesis performed at Faculty of Chemistry and Technology, University of Split and at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb.
Supervisors: PhD Tea Bilušić, Full Professor
PhD Greta Krešić, Full Professor

Short abstract

In this research the influence of freeze-drying, pasteurization and high intensity ultrasound treatment on the biological activity and *in vitro* gastrointestinal stability of the phenol compounds from cultivated blueberries, was investigated. The effect of applied processing methods was investigated on: phenolic profile, antioxidant activity, polyphenol oxidase activity and also on stability and biological activity of phenolic compounds after simulated *in vitro* digestion in the stomach and in the small intestine using human digestive enzymes. In addition, the effect of blueberry extracts incapsulation on the prolongation of the oxidative stability of extra virgin olive oil has been tested. The results of this study have shown that freeze-drying is an effective method for preserving blueberry phenolic compounds and their antioxidant activity as well as for the inactivation of polyphenol oxidase. The results after *in vitro* digestion demonstrated that the use of freeze-drying and high intensity ultrasound can provide better gastrointestinal stability of the blueberry phenolic compounds. The encapsulated blueberry extracts significantly enhanced the oxidative stability of extra virgin olive oil. The microemulsion encapsulation had a better effect compared to the extracts encapsulated in the liposomes.

Number of pages: 165
Number of figures: 33
Number of tables: 45
Number of references: 268
Original in: Croatian

Keywords: antioxidant activity; antiproliferative activity; blueberry; phenolic compounds; *in vitro* digestion; encapsulation; freeze-drying; pasteurization; polyphenol oxidase; high intensity ultrasound

Date of the thesis defense:

Reviewers:
1. **PhD Verica Dragović-Uzelac, Full Professor**
2. **PhD Anet Režek Jambrak, Full Professor**
3. **PhD Daniela Čačić Kenjerić, Full Professor**
4. **PhD Sandra Pedisić, Assistant 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

UTJECAJ METODA OBRADE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST FENOLA IZ KULTIVIRANE BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum* L.)

U ovom radu istražen je utjecaj liofilizacije, pasterizacije i ultrazvuka visokog intenziteta na biološku aktivnost i *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost fenolnih spojeva kultivirane borovnice. Fenolni profil uzoraka određen je primjenom spektrofotometrijske metode te tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primijenjene su metode DPPH i FRAP, a Rancimat metodom ispitan je utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na produženje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja prije i nakon postupka inkapsulacije fenola. Učinak primijenjenih metoda obrade kultivirane borovnice ispitan je i na aktivnost enzima polifenol oksidaze. Stabilnost te antioksidacijska i antiproliferacijska aktivnost fenolnih spojeva kultivirane borovnice određena je i nakon simulirane *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu primjenom humanih probavnih enzima.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je liofilizacija učinkovita metoda za očuvanje fenolnih spojeva borovnice i njihove antioksidacijske aktivnosti kao i za smanjenje aktivnosti enzima polifenol oksidaze. Visoka stabilnost fenolnih spojeva određena je nakon provedene *in vitro* želučane faze probave, a najveća stabilnost određena je u liofiliziranom uzorku. *In vitro* probava u tankom crijevu uzrokovala je gotovo potpun gubitak antocijana dok je prosječni gubitak flavonol glikozida iznosio 60%, međutim u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima došlo je do porasta koncentracije fenolnih kiselina. Najveća antioksidacijska aktivnost nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu određena je u liofiliziranom uzorku. *In vitro* probava u želucu nije imala učinak na antiproliferacijsku aktivnost fenolnih spojeva borovnice, dok je značajno smanjenje aktivnosti uočeno nakon *in vitro* probave u tankom crijevu nakon perioda od 48 i 72 sata.

Inkapsulirani ekstrakti borovnice značajno su produljili oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, a inkapsulacija u mikroemulzije imala je bolji učinak u odnosu na ekstrakte inkapsulirane u liposome.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost; antiproliferacijska aktivnost; borovnica; fenolni spojevi; *in vitro* probava; inkapsulacija; liofilizacija; pasterizacija; polifenol oksidaza; ultrazvuk visokog intenziteta

ABSTRACT

INFLUENCE OF DIFFERENT PROCESSING METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITIES AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF PHENOLICS FROM CULTIVATED BLUEBERRIES (*Vaccinium corymbosum* L.)

In this research the influence of freeze-drying, pasteurization and high intensity ultrasound treatment on the biological activity and *in vitro* gastrointestinal stability of the phenolic compounds from cultivated blueberries, was investigated. The phenolic profile of the blueberry samples was determined using a spectrophotometric method and high performance liquid chromatography. Antioxidant activity was determined using DPPH and FRAP methods, and with Rancimat method the effect of phenolic extracts on the prolongation of the oxidation process of extra virgin olive oil, was determined. The prolongation of the oxidative stability of extra virgin olive oil has been tested before and after the phenolics encapsulation process. The influence of the applied processing methods has also been tested on the activity of polyphenol oxidase enzyme. Stability, antioxidant and antiproliferative activity of blueberry phenolic compounds was also determined after simulated *in vitro* digestion in the stomach and in the small intestine using human digestive enzymes.

The results of this study have shown that freeze-drying is an effective method for preserving blueberry phenolic compounds and their antioxidant activity as well as for the inactivation of polyphenol oxidase. High stability of the phenolic compounds was determined after *in vitro* digestion in the stomach and the highest stability was determined in the freeze-dried sample. *In vitro* digestion in the small intestine caused almost complete loss of anthocyanin while the average loss of flavonol glycoside was 60%, however, in all ultrasound treated samples the concentration of phenolic acids increased. The highest antioxidant activity after *in vitro* digestion in the stomach and in the small intestine was determined in the freeze-dried sample. *In vitro* digestion in the stomach had no effect on the antiproliferative activity of blueberry phenolic compounds, while a significant decrease in activity was observed after *in vitro* digestion in the small intestine, after 48 and 72 hours.

The encapsulated blueberry extracts significantly enhanced the oxidative stability of extra virgin olive oil. The microemulsion encapsulation had a better effect compared to the extracts encapsulated in the liposomes.

Key words: antioxidant activity; antiproliferative activity; blueberry; phenolic compounds; *in vitro* digestion; encapsulation; freeze-drying; pasteurization; polyphenol oxidase; high intensity ultrasound.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 2

2.1. Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.): kemijski sastav i nutritivni značaj 2

2.2. Fenolni spojevi 5

2.2.1. Klasifikacija i izvori fenolnih spojeva 5

2.2.2. Povoljni učinci fenolnih spojeva na zdravlje 10

2.2.3. Stabilnost fenolnih spojeva 13

2.2.4. Fenolni spojevi borovnice 17

2.3. Metode obrade s ciljem očuvanja biološke aktivnosti fenolnih spojeva 19

2.3.1. Liofilizacija 19

2.3.1.1. Mehanizam djelovanja 19

2.3.1.2. Primjena u prehrambenoj industriji 20

2.3.1.3. Utjecaj na fenolne spojeve 21

2.3.2. Ultrazvuk visokog intenziteta 22

2.3.2.1. Mehanizam djelovanja 22

2.3.2.2. Primjena u prehrambenoj industriji 24

2.3.2.3. Utjecaj na fenolne spojeva 25

2.4. *In vitro* modeli za ispitivanje probave fitokemikalija 26

2.4.1. Otpuštanje fenola iz matriksa hrane tijekom gastrointestinalne probave 27

2.4.2. Primjena humanih enzima u *in vitro* modelu probave hrane 29

2.5. Inkapsulacija fenolnih spojeva 31

2.5.1. Primjena emulzijskih sustava 31

2.5.2. Primjena liposoma 34

2.6. Pregled dosadašnjih istraživanja 36

3. MATERIJALI I METODE **38**

3.1. Materijali 38

3.2. Metode 38

3.2.1. Određivanje udjela vode i suhe tvari borovnice 38

3.2.2. Metode obrade uzoraka borovnice 38

3.2.2.1. Liofilizacija 38
3.2.2.2. Pasterizacija 38
3.2.2.3. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta 39
3.2.3. Određivanje fenolnih spojeva iz borovnice 40
3.2.3.1. Priprema ekstrakata 40
3.2.3.2. Priprema nativnih uzoraka 40
3.2.3.3. Određivanje udjela ukupnih fenola spektrofotometrijskom tehnikom 41
3.2.3.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva tehnikom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije 42
3.2.4. Određivanje biološke aktivnosti 44
3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 44
3.2.4.1.1. DPPH metoda 44
3.2.4.1.2. FRAP metoda 45
3.2.4.1.3. Rancimat metoda 46
3.2.4.2. Određivanje antiproliferacijske aktivnosti 47
3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima polifenol oksidaze 48
3.2.6. *In vitro* dvofazni model probave 49
3.2.6.1. Prikupljanje probavnih sokova donora 49
3.2.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti probavnih sokova 49
3.2.6.3. Postupak *in vitro* probave 50
3.2.7. Inkapsulacija ekstrakata borovnice 51
3.2.7.1. Priprema mikroemulzija 51
3.2.7.2. Priprema liposoma 51
3.2.7.3. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma 52
3.3. Statistička obrada podataka 52

4. REZULTATI 54
4.1. Utjecaj metoda obrade na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost fenola borovnice 54
4.1.1. Fenolni profil nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice 54
4.1.2. Antioksidacijska aktivnost nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice 66
4.2. Utjecaj metoda obrade na aktivnost enzima polifenol oksidaze iz borovnice 72

4.3. Utjecaj metoda obrade na *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost i biološku aktivnost fenolnih spojeva borovnice 73
4.3.1. Fenolni profil uzoraka nakon *in vitro* probave 73
4.3.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave 96
4.3.3. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave 103
4.4. Utjecaj inkapsulacije na antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva borovnice 108
4.4.1. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma 108
4.4.2. Učinak inkapsuliranih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost maslinovog ulja 110

5. RASPRAVA 111
5.1. Utjecaj metoda obrade na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost fenola borovnice 111
5.1.1. Fenolni profil nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice 111
5.1.2. Antioksidacijska aktivnost nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice 116
5.2. Utjecaj metoda obrade na aktivnost enzima polifenol oksidaze iz borovnice 120
5.3. Utjecaj metoda obrade na *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost i biološku aktivnost fenolnih spojeva borovnice 122
5.3.1. Fenolni profil uzoraka nakon *in vitro* probave 122
5.3.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave 129
5.3.3. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave 132
5.4. Utjecaj inkapsulacije na antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva borovnice 134
5.4.1. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma 134
5.4.2. Učinak inkapsuliranih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost maslinovog ulja 136

6. ZAKLJUČCI 138

7. LITERATURA 140

1. UVOD

Fenolni spojevi najzastupljenije su fitokemikalije u čovjekovoj prehrani s vrlo raznolikim kemijskim strukturama i biološkim funkcijama kao što su antioksidativna, protu-upalna, antimikrobna, antikancerogena, antiaterosklerotična i antihiperlipemična (Del Rio i sur., 2013; Haminiuk i sur., 2012). Povrće, cjelovite žitarice, čokolada i pića poput čaja, kave i vina značajan su izvor fenolnih spojeva u prehrani, ali među najbogatije izvore po jedinici serviranja ubraja se kultivirana borovnica (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Povoljni učinci fenolnih spojeva na zdravlje ne ovise samo o prehrambenom unosu već i o njihovoj stabilnosti na koju utječu mnogi čimbenici tijekom obrade i skladištenja namirnica kao što su temperatura, pH, kisik, enzimi i drugi sastojci hrane. Konvencionalne metode obrade hrane kao što je pasterizacija, koje se još uvijek najčešće koriste, osiguravaju mikrobiološku stabilnost i duži rok trajanja, ali mogu uzrokovati gubitak fenola i drugih bioaktivnih spojeva (Brownmiller i sur., 2008). Zbog toga su istraživanja danas sve više usmjerena na primjenu liofilizacije te razvoj novih tehnologija prerade hrane kao što su pulsirajuće električno polje, ultrazvuk visokog intenziteta i obrada visokim tlakom kojima se nastoje očuvati izvorna svojstva namirnice (Barba i sur., 2017; Sablani i sur., 2011). Osim novih tehnologija koje se istražuju u svrhu očuvanja fenolnih spojeva, primjena metoda inkapsulacije može dodatno osigurati njihovu zaštitu i produljenje biološke aktivnosti (Đorđević i sur., 2015).

Na stabilnost fenolnih spojeva utječu i brojni drugi čimbenici tijekom probave hrane kao što su matriks hrane, prisutnost makronutijenata i prehrambenih vlakana, probavni enzimi i mikrobiota. Razumijevanje njihove uloge i njihovih međusobnih interakcija važno je za procjenu biološkog značaja i učinkovitosti fenolnih spojeva kao funkcionalnih sastojaka hrane. U tom smislu *in vitro* modeli probave hrane mogu biti koristan alat za procjenu navedenih čimbenika, a pokazano je i da mogu dobro korelirati s rezultatima studija provedenim na ljudima i životinjama (Bouayed i sur., 2011).

Ciljevi ovog istraživanja su: a) odrediti i usporediti fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost netretirane te liofilizirane, pasterizirane i ultrazvukom visokog intenziteta obrađene borovnice; b) ispitati učinak primijenjenih metoda obrade na aktivnost enzima polifenol oksidaze; c) odrediti stupanj *in vitro* gastrointestinalne stabilnosti fenolnih spojeva te njihove antioksidacijske i antiproliferacijske aktivnosti primjenom humanih probavnih enzima; d) inkapsulacija fenolnih ekstrakata borovnice u mikroemulzije i liposomske sustave određivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja prije i nakon postupka inkapsulacije.

2. OPĆI DIO

2.1. Kultivirana borovnica (*Vaccinium corynbosum* L.): kemijski sastav i nutritivni značaj

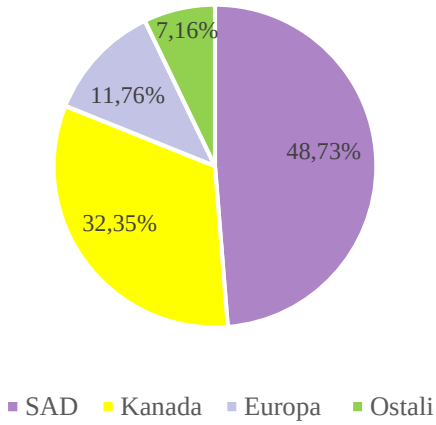
Borovnica (*Vaccinium*) je rod listopadnih grmova iz porodice crnjuša (*Ericaceae*) (Anonimous, 2016). Iako rod Vaccinium obuhvaća relativno velik broj vrsta, u Hrvatskoj su nativne samo tri vrste (*V. myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L. i *V. uliginosum* L.), dok je kultivirana borovnica (*V. corymbosum*) uvezena iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) 1964. godine. Kultivirana borovnica još se naziva i američka borovnica budući je njezin uzgoj prvi započeo u SAD-u 1893. godine (Dujmović Purgar i sur., 2007). Višegodišnja je drvenasta biljka, razgranatog korijena i stabljike, a plod je tamnoplava mesnata boba s ostacima čaške na vrhu (Slika 1).



a) b) c)

Slika 1. Kultivirana borovnica (*V. corymbosum*); a) cvat, b) formirani nezreli plod, c) zreli plod (Anonimous, 2016)

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, eng. *Food and Agriculture Organization*) 2016. godine u svijetu je proizvedeno 552.505 tona borovnica, a u odnosu na posljednjih 10 godina (2006. godine 262.002 tone) proizvodnja je udvostručena (FAO, 2016). Najveći proizvođači u svijetu su SAD i Kanada (Slika 2), a u Europi Poljska i Njemačka.



Slika 2. Doprinos pojedinih regija globalnoj proizvodnji borovnica (FAO, 2016)

Osim proizvodnje, o povećanom interesu za borovnicama i njenim prerađevinama govori i podatak da je u razdoblju između siječnja 2011. i kolovoza 2015. godine na tržištu Europske Unije pušteno u promet 4.997 novih proizvoda koji sadrže borovnice (AAFC, 2016).

Borovnice su, uz jagode, među najpopularnijim bobičastim voćem na tržištu. Dobar su izvor esencijalnih vitamina i minerala te sadrže raznolike fenolne spojeve koji utječu na boju, okus i nutritivnu vrijednost (Talcott, 2007). Imaju nisku energetsku vrijednost (56 kcal/100 g) te značajan udio prehrambenih vlakana i vrlo malu količinu masti. Mnogi čimbenici utječu na kemijski sastav borovnica uključujući uvjete i mjesto uzgoja, sortu, stupanj zrelosti te način skladištenja (Del Rio i sur., 2010). Usporedba prosječnog osnovnog kemijskog sastava borovnice prema nacionalnim i američkim tablicama prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Prosječni osnovni kemijski sastav borovnice na 100 g jestivog djela (Kaić-Rak i Antonić, 1990; USDA, 2015)

Nutrijent	Nacionalni podaci	Američki podaci
Voda (g)	85,00	84,21
Bjelančevine (g)	0,60	0,74
Masti (g)	0,60	0,33
Ugljikohidrati (g)	14,30	14,49
Prehrambena vlakna (g)	/	2,40

Sadržaj šećera (glukoze, fruktoze i saharoze) u borovnicama uravnotežen je prisutnošću organskih kiselina, poput limunske i jabučne, koje su odgovorne za gorak i opor okus te zajedno doprinose aromi, okusu i teksturi ploda. Na kvalitetu borovnica utječe i aktivnost oksidacijskih enzima, polifenol oksidaze i peroksidaze, čiji se udio povećava tijekom sazrijevanja, a mogu uzrokovati gubitak boje, nutritivnih komponenti i opće prihvatljivosti ploda (Talcott, 2007).

U Tablici 2. prikazana je prosječna količina odabranih vitamina i minerala u svježem plodu borovnice prema nacionalnim i američkim tablicama. Najveće odstupanje uočeno za sadržaj vitamina C čiji je udio prema nacionalnim tablicama čak 2,3 puta veći u odnosu na podatak u američkim tablicama o kemijskom sastavu namirnica i pića.

Tablica 2. Prosječni sastav vitamina i minerala borovnice na 100 g jestivog djela (Kaić-Rak i Antonić, 1990; USDA, 2015)

Vitamin / mineral	Nacionalni podaci	Američki podaci
Vitamin A (µg)	22,00	16,21
Vitamin C (mg)	22,00	9,70
Tiamin (mg)	0,00	0,04
Riboflavin (mg)	0,00	0,04
Kalcij (mg)	10,00	6,00
Magnezij (mg)	2,00	6,00
Željezo (mg)	0,70	0,28
Cink (mg)	0,10	0,16
Natrij (mg)	1,00	1,00
Kalij (mg)	65,00	77,00

Najzastupljeniji pigmenti odgovorni za tamnoplavu boju plodova borovnice su antocijani, ali boji mogu doprinijeti i karotenoidi koji se nalaze u koncentraciji do 46 µg/g suhe tvari voća. Iako su te koncentracije niske u odnosu na ostalu hranu bogatu karotenoidima, njihova prisutnost zajedno s antioksidacijskim vitaminima i fenolnim spojevima doprinosi velikoj fitokemijskoj raznolikosti te povoljnim učincima borovnice na zdravlje (Talcott, 2007).

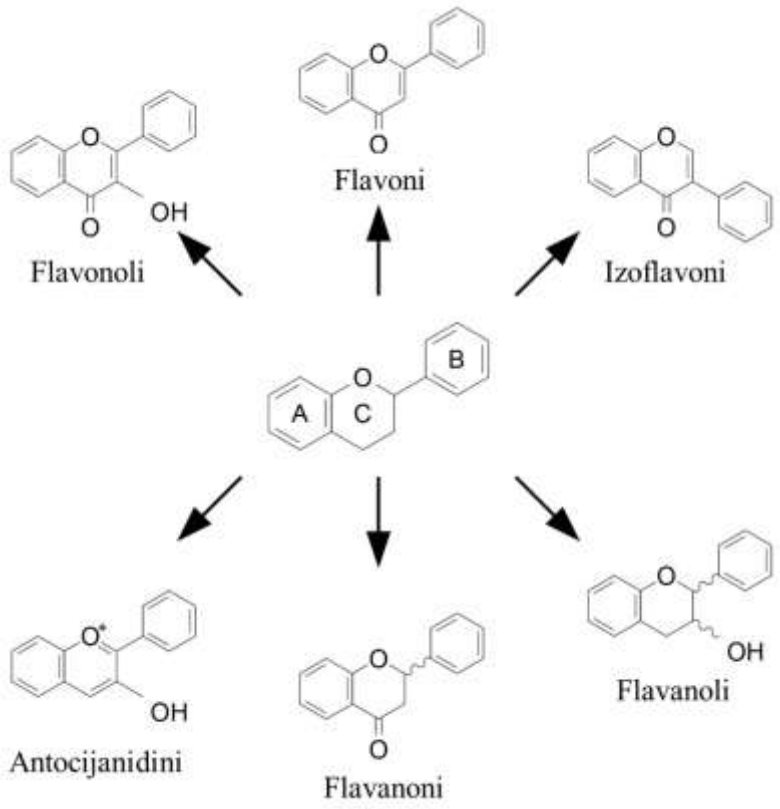
2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima, a primarna uloga im je zaštita biljke od insekata, UV zračenja i mikrobnih infekcija te privlačenje oprašivača (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011; Rodriguez-Mateos i sur., 2014). Strukturno su vrlo raznolika skupina fitokemikalija, među kojima se obično razlikuju flavonoidi i nekoliko vrsta ne-flavonoida. (Del Rio i sur., 2013). Voće, povrće, cjelovite žitarice, čokolada i pića poput čaja i vina bogat su izvor fenolnih spojeva.

Fenoli nisu esencijalne komponente hrane ali postoje brojni dokazi da umjeren i dugotrajan unos može imati povoljan utjecaj na incidenciju karcinoma i kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa 2 i smanjenje kognitivnih funkcija, koje se sve češće javljaju u zapadnjačkoj populaciji (Del Rio i sur., 2013). Povoljan utjecaj na zdravlje imaju zahvaljujući svojem antioksidacijskom, antimikrobnom, antikancerogenom, protuupalnom i vazodilatacijskom djelovanju (Landete, 2012). Biološka svojstva i blagotvorni zdravstveni učinci fenola uvelike ovise o prehrambenom unosu ali i o njihovoj stabilnosti te bioraspoloživosti.

2.2.1. Klasifikacija i izvori fenolnih spojeva

Fenolni spojevi se u voću i povrću nalaze u obliku glikozida, vezani za šećere, a njihova klasifikacija u ovom radu prikazana je u skladu s kemijskim strukturama aglikona prema Del Rio i sur. (2013). Sadrže barem jedan aromatski prsten, a klasificiraju se u različite skupine s obzirom na broj aromatskih prstena i strukturnih elemenata koji vežu te prstene međusobno. Fenoli se prema svojoj strukturi dijele u dvije velike skupine: flavonoidi i ne-flavonoidi. Flavonoidi su najveća skupina fenolnih spojeva i široko su rasprostranjeni u biljkama, posebno u voću. Sadrže dva aromatska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) (Slika 3), a glavne skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, flavanoni i antocijanidini. Međusobno se razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, stupnju nezasićenosti te broju i položaju OH skupina. Biološka aktivnost flavonoida, uključujući antioksidacijsku aktivnost, znatno ovisi o njihovoj strukturi i načinu glikozilacije (Tsao, 2010).



Slika 3. Osnovna kemijska struktura i podjela flavonoida (Del Rio i sur., 2013)

Flavonoli su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, a najpoznatiji predstavnici ove skupine su kampferol, kvercetin i miricetin. Podaci o sadržaju flavonola u najčešće konzumiranom voću, povrću i pićima značajno variraju najvjerojatnije zbog lokalnih uvjeta rasta, sezonskih promjena i sortnih razlika. Najznačajniji prehrambeni izvori ove skupine flavonoida su žuti i crveni luk te špinat ali najbogatiji izvori su kapari, šafran i meksički origano. U Tablici 3 prikazani su najbogatiji prehrambeni izvori flavonoida prema *Phenol-Explorer* bazi podataka. *Phenol-Explorer* najopsežnija je baza podataka o sadržaju polifenola u namirnicama, dostupna online od 2009. godine, a izrađena je na temelju prikupljenih podataka više od 1.300 znanstvenih radova (Neveu i sur., 2010).

Flavoni nisu široko rasprostranjeni iako su značajne količine zabilježene u celeru, menti, peršinu i drugom začinskom bilju (Tablica 3). Najpoznatiji predstavnici ove skupine su apigenin i luteolin. Tangeretin i nobiletin su posebna vrsta flavona, tzv. polimetoksilirani flavoni, koji se pojavljuju samo u tkivima i ljuskama agruma kao što su mandarina, grejpfrut i naranča. Ovi flavoni imaju metilirane hidroksilne skupine koje povećavaju njihovu metaboličku stabilnost i poboljšavaju oralnu biodostupnost (Evans i sur., 2010).

Najbolji izvori *izoflavona* su mahunarke, a naročito soja koja sadrži značajne količine daidzeina i genisteina (Tablica 3). Fermentirani proizvodi soje sadrže aglikone, kao rezultat hidrolize glikozida, dok proizvodi čija proizvodnja uključuje grijanje, kao što su sojino mlijeko i tofu, sadrže smanjene količine izoflavona (Manach, 2004). Kemijska struktura izoflavona vrlo je slična estrogenu pa se stoga ubrajaju i u skupinu fitoestrogena, kao i ne-flavonoidni lignani. Zbog njihove sposobnosti da se vežu na receptore estrogena, soja i izoflavoni u obliku dodataka prehrani doprinose regulaciji hormonalne ravnoteže u žena te mogu biti potencijalna alternativa konvencionalnoj hormonskoj terapiji (Messina, 2014).

Flavanoli su najsloženija skupina flavonoida u rasponu od jednostavnih monomera (katehin i epikatehin) do oligomera i polimera (proantocijanidini) te ostalih izvedenih spojeva (teaflavini i tearubigini) (Mena i sur., 2014). Sadrže dva kiralna centra što im omogućuje stvaranje izomera, a dva najrasprostranjenija su već spomenuti (+)-katehin i (-)-epikatehin. Iako su rasprostranjeni u mnogim vrstama voća, kao što su jagode, jabuke i breskve, najbogatiji izvori ove skupine flavonoida su kakao, čokolada te zeleni i crni čaj (Tablica 3). Zeleni čaj bogat je izvor monomernih flavonoida čija se koncentracija smanjuje fermentacijom pri proizvodnji crnog čaja, uglavnom zbog aktivnosti enzima polifenol oksidaze, ali istodobno dolazi do akumuliranja teaflavina i tearubigina (Del Rio i sur., 2013). Oligomeri i polimeri flavanola, poznati kao kondenzirani tanini ili proantocijanidini, uglavnom se sastoje od međusobno povezanih jedinica (epi)katehina nazvanih procijanidini. Odgovorni su za opor okus nekih vrsta voća i pića te za gorak okus čokolade (Manach, 2004).

Antocijani su skupina flavonoida odgovorna za boju biljnih tkiva (cvjetova, lišća, plodova i korijenja) u rasponu od crvene, ljubičaste i plave, ovisno o pH vrijednosti i kemijskoj strukturi. Najvažniji su biljni pigmenti s više od 600 spojeva identificiranih u prirodi (Riaz i sur., 2016). Široko su rasprostranjeni u raznom bobičastom voću, šljivama i trešnjama te tamno obojenom povrću kao što su ljubičasti kupus, patlidžan i rotkvica, a udio antocijana proporcionalan je intenzitetu boje. Najčešći aglikoni antocijana su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. Budući su u obliku aglikona vrlo nestabilni vežu se za šećere u obliku glikozida što im omogućuje otpornost na svjetlo, pH i oksidaciju (Manach, 2004).

Flavanoni se u najvećim koncentracijama nalaze u začinskom bilju i citrusima (Tablica 3), a odgovorni su i za gorak okus grejpa i nekih sorti naranči. Najpoznatiji predstavnici ove skupine flavonoida su narigenin i hesperetin.

Tablica 3. Odabrani prehrambeni izvori flavonoida (Neveu i sur., 2010)

Skupina flavonoida	Izvori u hrani	mg/100 g
Flavonoli	Kapari	654,71
	Šafran	509,99
	Meksički origano, suhi	272,07
	Crveni luk	128,51
	Špinat	119,27
Flavoni	Sjemenke celera	2094,00
	Metvica, suha	1486,29
	Verbena (sporiš), svježa	790,00
	Meksički origano, suhi	733,77
	Listovi celera, svježi	133,38
Izoflavoni	Sojino brašno	466,99
	Sojina pasta (cheonggukang)	264,40
	Zrna soje, pržena	246,95
	Tempeh	147,72
	Soina pasta, nato	103,90
Flavanoni	Metvica, suha	8739,98
	Meksički origano, suhi	1049,67
	Melogold (hibrid grejpa i pomela), sok	67,08
	Naranča, sok iz koncentrata	61,29
	Ružmarin, svježi	55,05
Antocijani	Crna bazga	1316,65
	Aronija	878,12
	Crni ribiz	592,23
	Kanadska borovnica	187,23
	Kupina	172,59
Flavanoli	Kakao u prahu	511,62
	Čokolada, tamna	212,36
	Bob	154,45
	Infuzija crnog čaja	73,30
	Infuzija zelenog čaja	71,17

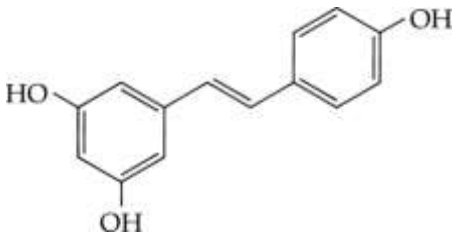
Najveći prehrambeni značaj iz skupine ne-flavonoida imaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani. *Fenolne kiseline* su skupina jednostavnih fenola koje na benzenskom prstenu sadrže najmanje jednu karboksilnu skupinu. Prema strukturi mogu se podijeliti u dvije skupine, benzojeva i cimetna kiselina i njihovi derivati (Slika 4). Najvažniji derivati benzojeve kiseline su galna i elaginska kiselina koje se nalaze u raznim vrstama voća kao što su maline, brusnice i nar ali i u orašastim plodovima (npr. kesten sadrži 1215,22 mg hidroksibenzojeve kiseline na 100 g) (Neveu i sur., 2010). Hidroksibenzojeve kiseline su i sastavni dio složenih struktura kao što su hidrolizirani tanini (npr. galotanini u mangu i elagitanini u jagodama i malinama) (Manach, 2004). Najvažniji derivati cimetne kiseline su kumarinska, kava, ferulinska i sinapinska kiselina. U hrani se često nalaze u vezanom obliku i mogu se osloboditi samo kiselinskom ili alkalnom hidrolizom, ili djelovanjem enzima. Kava kiselina jedna je od najrasprostranjenijih fenolnih kiselina i čini oko 87% ukupnog sadržaja hidroksicimetnih kiselina u voću (Manach, 2004), a osim toga, sastavni je dio klorogenske kiseline koja čini oko 10% zelenih zrna robusta kave. Redovitom konzumacijom kave dnevno možemo unijeti više od 1 g klorogenske kiseline što znači da za mnoge kava predstavlja glavni izvor fenolnih spojeva (Del Rio i sur., 2013).



a) b)

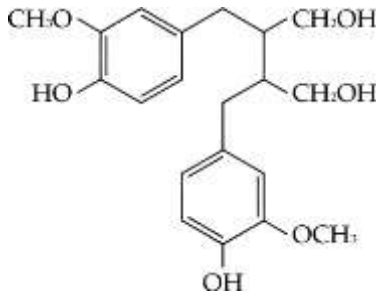
Slika 4. Kemijska struktura hidroksibenzojeve (a) i hidroksicimetne (b) kiseline (Manach, 2004)

Stilbeni su fitoaleksini koje biljke proizvode tijekom stresa, bolesti ili ozljede. Najpoznatiji predstavnik ove skupine fenolnih spojeva je resrevatrol (Slika 5), a najbolji prehrambeni izvori su grožđe i crno vino. Resveratrol je vezan uz fenomen poznat pod imenom „francuski paradoks“ kojim je uočeno da Francuzi konzumiraju značajne količine zasićenih masnih kiselina, a rijetko obolijevaju od kardiovaskularnih bolesti i imaju duži životni vijek u usporedbi s populacijama ostalih europskih zemalja. Smatra se da njihova redovita konzumacija crnog vina ima ključnu ulogu u sprječavanju bolesti srca (Haminiuk i sur., 2012).



Slika 5. Kemijska struktura resveratrola (Manach, 2004)

Lignani se sastoje od dvije fenilpropanske jedinice povezane ugljikovim mostom što im omogućuje stvaranje mnogo različitih kemijskih struktura u prirodi (Slika 6). Ubrajaju se i u skupinu fitoestrogena, kao i već spomenuti izoflavoni. Nalaze se u hrani bogatoj vlaknima kao što su žitarice i mahunarke, a najbolji prehrambeni izvor su lanene sjemenke. Sekoizolaricirezinol i imatairezinol su najpoznatiji lignani lanenih sjemenki koji djelovanjem crijevne mikroflore prelaze u aktivne metabolite, enterodiol i enterolakton, koji posjeduju aktivnost sličnu estrogenu (Aehle i sur., 2011).



Slika 6. Kemijska struktura lignana (Manach, 2004)

2.2.2. Povoljni učinci fenolnih spojeva na zdravlje

Mnoge epidemiološke studije i meta-analize dokazale su da prehrana bogata voćem i povrćem može smanjiti incidenciju raznih kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, infarkt, dijabetes tipa 2 i karcinom (Bohn, 2014). Blagotvorni učinci ovakve prehrane upravo se pripisuju sadržaju fenola stoga su aktualna tema znanstvenih istraživanja.

Velika španjolska studija PREDIMED (*Prevención con Dieta Mediterránea*) ispitala je dugoročne učinke Mediteranske prehrane koja sadrži namirnice bogate fenolnim spojevima, na učestalost kardiovaskularnih bolesti kod zdravih, ali visokorizičnih ispitanika. Rezultati su pokazali da je veći unos fenolnih spojeva, osobito flavanola, lignana i hidroksibenzojeve kiseline, smanjio rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti za 46% (Tresserra-Rimbau i sur., 2014a). Cilj ove studije bio je i istražiti učinak unosa fenola na smrtnost svih uzroka te je dokazano da su ispitanici s višim unosom fenola (> 1g/dan) imali 37% niži rizik smrtnosti u usporedbi s onima koji su unosili manje od 642 mg/dan. Fenoli s najsnažnijim preventivnim učinkom bili su stilbeni i lignani, dok za flavonoide i fenolne kiseline nije ustanovljen značajan utjecaj na smanjenje rizika smrtnosti (Tresserra-Rimbau i sur., 2014b). Međutim, rezultati Europskog prospektivnog istraživanja o karcinomu i prehrani (EPIC studija, eng. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) pokazali su da veći unos flavonoida (>447,8 mg/dan) smanjuje rizik od smrtnosti, posebno flavanoni i flavonoli čiji je unos povezan s 40 i 41% manjim rizikom od smrtnosti (Zamora-Ros i sur.; 2013). Iako su mnoge studije dokazale povoljan učinak, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se sa sigurnošću utvrdio povoljan učinak pojedinih grupa fenola te kako bi se definirao minimalan preporučeni dnevni unos. Preventivno djelovanje na pojavu kardiovaskularnih bolesti uglavnom se pripisuje antioksidacijskim svojstvima, no nedavni dokazi sugeriraju da vazodilatacijska, protuupalna i anti-aterogena svojstva fenola također doprinose smanjenju rizika od kroničnih bolesti (Quiñones i sur., 2013).

Istraživanja su pokazala da bi proizvodi obogaćeni polifenolima mogli biti korisni za kontrolu dijabetesa i prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Pretilim i hiperglikemičnim miševima je uz visoko-masnu prehranu dodano i sojino brašno obogaćeno polifenolima borovnice tijekom 13 tjedana. U usporedbi s kontrolnom skupinom (koja je dobivala neobogaćeno sojino brašno) skupina koja je unosila i polifenole borovnice smanjila je porast tjelesne težine, poboljšala toleranciju glukoze i smanjila nivo kolesterola i glukoze u krvi (Roopchand i sur., 2013). Cilj interventne studije koju su proveli Sarriá i sur. (2015) bio je procijeniti učinak dvaju funkcionalnih proizvoda kakaa (jedan bogat prehrambenim vlaknima, a drugi bogat polifenolima) na markere kardiovaskularnog zdravlja. Najznačajnije otkriće nakon konzumacije oba proizvoda bilo je povećanje HDL kolesterola koje se pripisuje flavanolima, najzastupljenijim flavonoidima u kakau, dok je proizvod obogaćen prehrambenim vlaknima bio povezan s hipoglikemijskim i protuupalnim učinkom. Tomé-Carniero i sur. (2016) navode da se funkcionalna hrana i dodaci prehrani bazirani na polifenolima mogu koristiti kao dodatne terapije u liječenju kardiovaskularnih bolesti.

Jedan od ciljeva liječenja i prevencije pretilosti i dijabetesa tipa 2 uključuje razvoj inhibitora koji bi smanjili razgradnju i apsorpciju lipida i ugljikohidrata. Istraživanja su pokazala da fenolni spojevi imaju potencijal da inhibiraju α-amilazu i α-glukozidazu te pankreasnu lipazu, ključne enzime za razgradnju ugljikohidrata i masti, čime preventivno djeluju na pojavu hiperlipidemije i omogućuju bolju kontrolu razine glukoze u krvi (Kim i sur., 2016; Buchholz i Melzig, 2015). Boath i sur. (2012) *in vitro* istraživanjem su pokazali da ekstrakti bobičastog voća, bogati polifenolima, mogu biti učinkoviti inhibitori α-amilaze i α-glukozidaze pri niskim koncentracijama. Najsnažniji inhibitori α-amilaze pokazali su se spojevi srodni taninima, elagitanini i proantocijanidini, iz maline i oskoruše, dok je najdjelotvorniji inhibitorni učinak na α-glukozidazu imao ekstrakt crnog ribiza bogat antocijanima i flavonolima. Fabroni i sur. (2016) ispitali su *in vitro* inhibicijsko djelovanje 13 liofiliziranih ekstrakata mediteranskog povrća, voća, mahunarki i žitarica koji su bogati antocijanima. Biljke s najvećim sadržajem antocijana (crvena naranča i sok nara) pokazale su najjače inhibicijsko djelovanje na pankreasnu lipazu, a pokazali su i da je korelacija između inhibicijskog djelovanja i sadržaja antocijana snažnija u odnosu na korelaciju između inhibicijskog djelovanja i ukupnog sadržaja polifenola u ekstraktima.

Fenolni spojevi pokazuju i mnoga antikancerogena svojstva, uključujući inhibitorni učinak na proliferaciju tumorskih stanica, stvaranje metastaza, angiogenezu kao i indukciju apoptoze (Niedzwiecki i sur., 2016). Mnoga istraživanja potvrdila su da bobičasto voće posjeduje učinkovita antikancerogena svojstva, kao i da antocijani u usporedbi s ostalim fenolima imaju najveći inhibitorni učinak na rast kultiviranih tumorskih stanica (Seeram i sur., 2006a). Bioaktivni spojevi bobičastog voća posjeduju antikancerogene učinke kroz različite komplementarne i preklapajuće mehanizme djelovanja, uključujući antioksidacijsko djelovanje, regulaciju enzima važnih u metabolizmu karcinogena i ksenobiotika, modulaciju ekspresije gena i njihove učinke na staničnu proliferaciju, modulaciju nuklearnih receptora, angiogenezu i apoptozu (Seeram, 2006b). Dosadašnja istraživanja pokazala su da fenolni spojevi borovnice mogu učinkovito inhibirati rast i metastatski potencijal staničnih linija karcinoma dojke (MDA-MB-231) (Adams i sur., 2010), staničnih linija kolorektalnog karcinoma (HT 29) (Correa-Betanzo i sur., 2014), staničnih linija karcinoma jetre (HepG2) (Jiao i sur., 2018) i stanica melanoma (B16-F10) (Wang i sur., 2017).

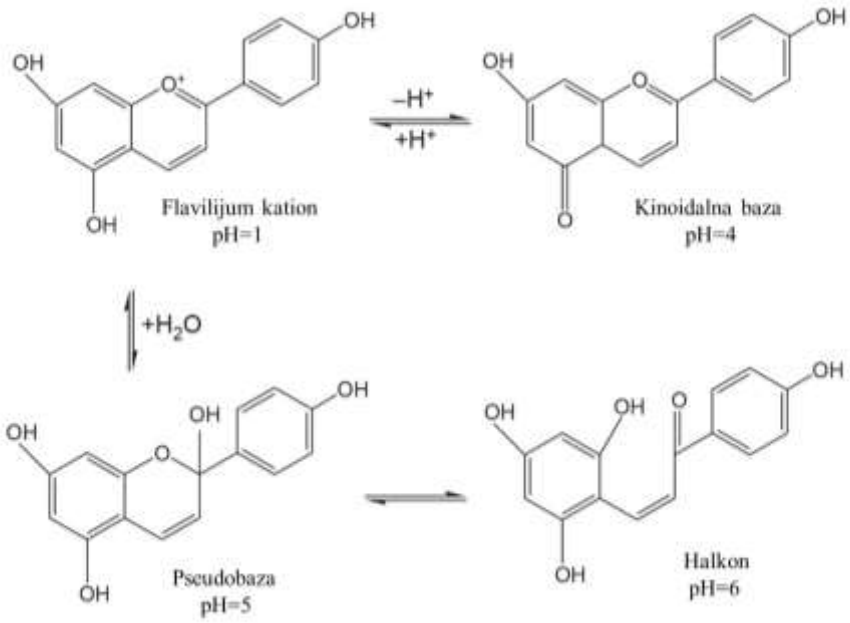
Uzrok spomenutih kroničnih bolesti može se jednim dijelom povezati s oksidacijskim stresom koji nastaje narušavanjem ravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih i dušikovih reaktivnih oblika te antioksidacijske zaštite. Oksidacijski stres i upale povezane s prekomjernom proizvodnjom reaktivnih oblika kisika (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*)

predstavljaju važnu komponentu u razvoju kroničnih degenerativnih bolesti (Hussain i sur., 2016). Fenolni spojevi mogu izravno djelovati na ROS ili stimulirati endogeni obrambeni sustav te time smanjiti oksidacijska oštećenja u organizmu (Landete, 2012). Borovnica je s tog aspekta posebno interesantna budući da su istraživanja pokazala da voće i povrće bogato antocijanima ima veći antioksidacijski potencijal u odnosu na namirnice bogate drugim vrstama fenolnih spojeva (Jacob i sur., 2012), a osim toga Wolfe i sur. (2008) ustanovili su, usporednom analizom 25 različitih vrsta voća, da nar i bobičasto voće (divlja i kultivirana borovnica te kupina i jagoda) imaju najveću staničnu antioksidacijsku aktivnost. Veliko opservacijsko istraživanje provedeno na 156.957 ispitanika tijekom 14 godina ustanovilo je da unos jagoda i borovnica smanjuje rizik od visokog krvnog tlaka (Cassidy i sur., 2011), a ovi rezultati potvrđeni su i manjim intervencijskim studijama. Stull i sur. (2010) proveli su randomizirano, dvostruko slijepo, placebom kontrolirano ispitivanje na pretilim ispitanicima s inzulinskom rezistencijom koji su konzumirali *smoothie* s 45 g liofiliziranog praha borovnice tijekom 6 tjedana. Količina konzumirane liofilizirane borovnice odgovarala je količini od 2 zdjelice svježih borovnica i sadržavala je 1462 mg ukupnih fenola te 668 mg antocijana. Ispitanicima koji su konzumirali borovnicu značajno se poboljšala inzulinska osjetljivost u odnosu na placebo grupu. Dvije su interventne studije pratile učinak konzumacije borovnica kod osoba s dijagnosticiranim metaboličkim sindromom tijekom 6 i 8 tjedana te zaključili da borovnice imaju imunomodulacijski učinak i da smanjuju oksidacijski stres i upalne procese u organizmu (Nair i sur., 2017) te da smanjuje krvni tlak, koncentraciju oksidiranog LDL kolesterola i produkte lipidne peroksidacije (Basu i sur. 2010). Navedeni rezultati interventnih istraživanja upućuju da djelovanje borovnica nije ograničeno na određeni organski sustav već da imaju sistemski učinak.

2.2.3. Stabilnost fenolnih spojeva

Fenoli se smatraju vrlo nestabilnim spojevima koji su podložni degradaciji i/ili reakciji, s primjerice kisikom ili metalnim ionima tijekom obrade ili skladištenja, što rezultira promjenom strukture i smanjenjem biološke aktivnosti. Na njihovu stabilnost, osim kisika i metalnih iona, utječu i brojni drugi čimbenici kao što su pH, temperatura, svjetlo, enzimi, proteini ili interakcije s drugim sastojcima hrane. Stabilnost fenolnih spojeva ključna je za nutritivnu vrijednost hrane i izravno je povezana s njihovom kemijskom strukturom (Deng i sur., 2018).

pH vrijednost glavni je čimbenik koji utječe na stabilnost fenolnih spojeva u voću i povrću. Općenito, što je niža pH vrijednost otopine veća je stabilnost fenola. Promjenom pH vrijednosti mijenja se njihova kemijska struktura što može utjecati i na njihove varijacije u boji. Na primjer, antocijanidni mogu mijenjati svoju kemijsku strukturu i boju ovisno o pH vrijednosti otopine (Slika 7). Antocijanidni su pri pH vrijednostima 1-2 prisutni u obliku flavilijum kationa koji je crveno obojen i koji predstavlja najstabilniji oblik antocijana (Bermúdez-Soto i sur., 2007). Povećanjem pH vrijednosti na 2-4 dolazi do gubitka protona i prelaska u kinoidalnu bazu plave boje. Daljnjim porastom na pH 5-6 dolazi do formiranja bezbojne pseudobaze i u konačnici do otvaranja heterocikličkog prstena i formiranja halkona. Pri pH vrijednostima većima od 7 dolazi do degradacije antocijanidina (Castañeda-Ovando i sur., 2009).



Slika 7. Promjene u kemijskoj strukturi antocijanidina ovisi o varijaciji pH vrijednosti (Castañeda-Ovando i sur., 2009)

Temperatura ima veliki utjecaj na stabilnost fenolnih spojeva stoga je kontrola temperature tijekom termičke obrade hrane i njenog skladištenja važna za održavanje njihove stabilnosti. Pasterizacija je još uvijek jedna od najčešće korištenih metoda termičke obrade

kojom se osigurava mikrobiološka stabilnosti i produžuje rok trajanja hrane, međutim može uzrokovati razgradnju fenolnih spojeva. Mnoga istraživanja potvrdila su da je viša temperatura učinkovitija u kontroli bakterijskog rasta ali također rezultira i većom redukcijom fenolnih spojeva. Na primjer, veći gubitak fenola (48,3%) primijećen je soku jabuke pasteriziranom na 94 °C u usporedbi s onim pasteriziranim na 72 °C (39,8%) (Noci i sur., 2008). Osim toga, i trajanje pasterizacije je važan čimbenik koji utječe na stabilnost fenola. Odrizola-Serrano i sur. (2008) proveli su pasterizaciju soka od jagode te ustanovili da je pasterizacija tijekom 1 minute dovela do veće degradacije fenola nego pri trajanju od 30 sekundi. I druge metode termičke obrade, kao što su blanširanje, kuhanje i kuhanje na pari rezultirale su gubitkom od 59%, 41% i 29% antocijana ljubičastog kupusa (Volden i sur., 2008). Slično tome, sadržaj procijanidina i antocijana grožđa i borovnice značajno se smanjio povećanjem temperature zagrijavanja s 60°C na 105°C (Khanal i sur., 2010). Osim smanjenja stabilnosti i sadržaja fenolnih spojeva termička obrada utječe i na njihov antioksidacijski kapacitet. Brownmiller i sur. (2008) ispitivali su utjecaj termičke obrade na proizvode borovnice i ustanovili da je osim značajnog gubitka antocijana (28 do 59%) došlo i do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta za 43 do 71%. Liu i sur. (2016) također su ustanovili značajno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta sibirske borovnice nakon pasterizacije pri 70°C tijekom 30 minuta.

Izgled, odnosno boja voća značajno je organoleptičko svojstvo i važan čimbenik prihvatljivosti svježeg voća ali i njihovih proizvoda. Prilikom proizvodnje voćnih sokova ili kaša dolazi do mehaničke povrede tkiva i pucanja stanične stjenke prilikom čega se oslobađaju degradativni *enzimi*, kao što je polifenol oksidaza. Monofenolni spojevi, uz prisustvo polifenol oksidaze i kisika, hidroksiliraju u difenole, koji se kasnije oksidiraju do o-kinona, a nastali kinoni dovode do formiranja smeđih pigmenata. Oslobađanjem ovog enzima osim narušavanja organoleptičkih svojstava dolazi i do smanjenja nutritivne kvalitete voća (Siddiq i Dolan, 2017). Aktivnost polifenol oksidaze proporcionalna je koncentraciji *kisika* a može se inaktivirati blagim povišenjem temperature do 50°C (Patras i sur., 2010). Siddiq i Dolan (2017) proveli su istraživanje o karakterizaciji enzima polifenol oksidaze kultivirane borovnice te ustanovili da se aktivnost enzima počela naglo smanjivati pri temperaturi većoj od 60°C, a gotovo potpuna inaktivacija enzima nastupila je pri temperaturi od 85°C. Osim polifenol oksidaze i enzim peroksidaza može oksidirati fenole u prisustvu vodikovog peroksida te su skupa odgovorni za degradaciju prirodnih pigmenata i fenolnih spojeva što dovodi do posmeđivanja i gubitka antioksidacijske aktivnosti (Deng i sur., 2018).

Fenolni spojevi pokazali su dobru stabilnost pri niskim temperaturama (4°C) što može biti povezano i s inhibicijom polifenol oksidaze pri niskim temperaturama (Wei i Zhang, 2008),

a Reque i sur. (2014) ustanovili su i dobru stabilnost antioksidacijskog kapaciteta plodova i soka borovnice tijekom skladištenja pri niskim temperaturama (4°C i -18°C).

Prisutnost *metalnih iona* ima različit utjecaj na antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva. Istraživanja su pokazala da su kelirani fenolni spojevi u nekim slučajevima učinkovitiji čistači slobodnih radikala nego fenolni spojevi bez vezanog metala. Na primjer, reakcija katehina s Cu^{2+} i Mn^{2+} povećava njihovu antioksidacijsku aktivnost, dok vezanje za Fe^{2+} smanjuje (Komatsu i sur., 1993). Međutim, neke studije navode mogućnost prooksidacijskog djelovanja fenola upravo radi njihovog vezanja za metalne ione (Deng i sur., 2018).

Izloženost *svjetlu* ubrzava degradaciju fenolnih spojeva što su potvrdila mnoga istraživanja (Deng i sur., 2018). Maier i sur. (2009) ustanovili su značajnu redukciju antocijana čuvanih pod neonskim svjetlom tijekom 24 sata u usporedbi s onima čuvanim u mraku, a osim toga svjetlo utječe i na ravnotežu kation ↔ halkon (Bursać-Kovačević, 2010).

Sumporov dioksid često se dodaje tijekom prerade voća kao konzervans ili antioksidans, međutim u voću s antocijanima izaziva izbjeljivanje boje zbog vezanja sulfita na položaju 2 ili 4. Nastali spoj je bezbojan ali stabilan, a uklanjanjem sulfita zagrijavanjem, zakiseljavanjem ili dodatkom karbonilnog spoja, antocijani se regeneriraju i vraća se crvena boja (Belitz i sur., 2004). Sumporov dioksid može i zaštitno djelovati na oksidaciju fenolnih spojeva inaktivirajući enzime polifenol oksidazu i peroksidazu te redukcijom nastalih kinona u polifenole (Deng i sur., 2018).

Askorbinska kiselina ima različit utjecaj na stabilnost fenolnih spojeva. Ima zaštitni utjecaj na stabilnost fenola smanjujući aktivnost enzima peroksidaze u svježe rezanoj dinji (Lamikanra i Watson, 2001) i svježe rezanoj jabuci (Jang i Moon, 2011), a smanjenjem koncentracije otopljenog kisika zaštitno djeluje na katehine čaja (Gramza i sur., 2005). Međutim, djeluje negativno na stabilnost antocijana, ubrzava njihovu degradaciju i može uzrokovati gubitak boje (Deng i sur., 2018). Oksidacija askorbinske kiseline može biti katalizirana prisustvom metalnih iona bakra, kositra, željeza i drugih, pri čemu nastaje dehidroaskorbinska kiselina i vodikov peroksid koji se direktno veže na položaj 2 ili na položaj 4 pa nastaje leuko forma (Bursać-Kovačević, 2010).

2.2.4. Fenolni spojevi borovnice

Kultivirana borovnica ubraja se u jedan od najbogatijih izvora fenolnih spojeva po jedinici serviranja i ima veći udio fenolnih spojeva od serviranja jagoda, kupina, malina ili crvenog ribiza (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Sadržaj ukupnih fenola u kultiviranoj borovnici iznosi 223,41 mg/100 g svježeg ploda (Neveu i sur., 2010), ali može varirati ovisno o sorti od 251 - 310 mg/100 g svježeg ploda (Giovanelli i Buratti, 2009). Osim sorte na udio fenolnih spojeva utječu i klimatski uvjeti što su potvrdili Dragović-Uzelac i sur. (2010). Analizirajući istu sortu kultivirane borovnice, uzgojenu u Hrvatskoj dvije godine za redom, ustanovili su da udio fenolnih spojeva može varirati od 331,34 mg do čak 528,15 mg/100 g svježeg ploda.

Flavonoidi su kvantitativno najzastupljeniji fenolni spojevi u borovnicama, među kojima se ističu značajni udjeli antocijana i flavonola (Dragović-Uzelac i sur., 2010). Udio antocijana u kultiviranim borovnicama kreće se od 20 do 269 mg/100 g svježeg ploda (Howard i Hager, 2007). Borovnice su, za razliku od ostalog bobičastog voća specifične zbog prisutnosti različitih vrsta antocijanidina uključujući malvidin, delfinidin, petunidin, cijanidin i peonidin koji vezanjem, najčešće za glukozu, galaktozu i arabinozu tvore stabilne monoglikozidne strukture. Najzastupljeniji su glikozidi malvidina i delfinidina koji mogu činiti do 75% svih identificiranih antocijana borovnice (Michalska i Łysiak, 2015). Od flavonola, u svježim plodovima borovnice najzastupljeniji su kvercetin i miricetin, a identificirano je čak 14 različitih derivata kvercetina. Udio ukupnih flavonola u kultiviranim borovnicama kreće se od 9 do 33 mg/100 g svježeg ploda (Howard i Hager, 2007). Iz skupine flavanola najzastupljeniji su procijanidini, sastavljeni od jedinica (epi)katehina, koji se nalaze u koncentraciji od 179,8 mg/100 g svježeg ploda. Najzastupljeniji su polimeri koji su svom sastavu sadrže više od 10 povezanih jedinica i čine 72% ukupnih procijanidina, dok su mono- di- i trimeri najmanje zastupljeni s ukupno 9% (Gu i sur., 2004).

Fenolne kiseline u borovnicama prisutne su u obliku estera, glikozida te u slobodnom obliku, a hidroksicimetne kiseline su zastupljene su u puno većoj koncentraciji u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. Ukupna koncentracija fenolnih kiselina u borovnici iznosi 136,48 mg/100 g svježeg ploda od čega hidroksicimentne kiseline čine 98,9% (Neveu i sur., 2010). Najzastupljenija fenolna kiselina je klorogenska kiselina, koja je ujedno i najzastupljeniji pojedinačni fenolni spoj u borovnicama. Može i sur. (2011) naveli su da udio klorogenske kiseline u borovnici iznosi 70 mg/100 g svježeg ploda te da je njena koncentracija tri puta veća nego u divljoj borovnici (*V. myrtillus* L.). Prema podacima dostupnim iz Phenol-Explorer baze koncentracija klorogenske kiseline iznosi 131,18 mg/100 g svježeg ploda (Neveu i sur., 2010).

Klorogenska kiselina važan je sastojak borovnice budući da djeluje kao kopigment koji povećava intenzitet boje antocijana (Michalska i Łysiak, 2015).

Na udio fenolnih spojeva borovnice utječe i zrenje ploda te su istraživanja pokazala da se udio antocijana zrenjem povećava, a udjeli flavonola i hidroksicimetnih kiselina smanjuju. Osim toga, antioksidacijska aktivnost borovnice te udio ukupnih fenola također imaju tendenciju smanjenja tijekom sazrijevanja (Castrejón i sur., 2008).

2.3. Metode obrade s ciljem očuvanja biološke aktivnosti fenolnih spojeva

Povoljni učinci fenolnih spojeva na zdravlje ne ovise samo o prehrambenom unosu već i o njihovoj stabilnosti na koju, osim spomenutih čimbenika, utječu i način obrade namirnice te uvjeti čuvanja (Michalska i Łysiak, 2015). Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju konvencionalna toplinska obrada hrane najčešće je korištena tehnologija u prehrambenoj industriji širom svijeta, međutim smanjuje stabilnost, sadržaj i antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva. Stoga se danas istražuju metode obrade hrane koje mogu očuvati fenole i druge biološki aktivne spojeve, kao što su liofilizacija i ultrazvuk visokog intenziteta (Barba i sur., 2017; Sablani i sur., 2011).

2.3.1. Liofilizacija

Liofilizacija se smatra jednim od najkvalitetnijih postupaka dehidratacije budući da osigurava dugotrajno očuvanje organoleptičkih svojstava i biološki aktivnih spojeva (Duan i sur., 2016). Razvila se početkom 20. stoljeća (1906. g.) iako su i drevne civilizacije prepoznale značaj sušenja smrzavanjem. Drevne Inke su tu tehniku koristile za sušenje (dehidrataciju) smrznutog mesa pod utjecajem sunčevog zračenja na rijetkom planinskom zraku (niski tlak) (Rey i May, 2010). Prvenstveno se koristila za dehidrataciju biološkog materijala poput krvi, plazme i antibiotika, a tijekom 2. svjetskog rata primjena liofilizirane hrane proširila se u SAD-u i Velikoj Britaniji prvenstveno za potrebe vojske (Lovrić, 2003). Liofilizacija se danas primjenjuje u različitim granama industrije od kemijske, biotehnološke i prehrambene pa sve do farmaceutske industrije.

2.3.1.1. Mehanizam djelovanja

Osnovni princip liofilizacije zasniva se na uklanjanju vode sublimacijom leda iz prethodno smrznutog proizvoda, a to se postiže podvrgavanjem zamrznutog proizvoda djelovanju topline pod odgovarajućim podtlakom (vakuumom). Budući se uklanjanje vode iz proizvoda vrši sublimacijom leda, ne dolazi do migracije aromatskih, mirisnih, okusnih i drugih lakohlapljivih sastojaka prema površini proizvoda, što je karakteristika ostalih metoda dehidratacije. Time ne dolazi do stvaranja površinske „kore“ koja usporava proces dehidratacije i koja često predstavlja mjesto intenzivnih degradacijskih pojava (Lovrić, 2003.).

Upravo iz tog razloga, liofilizacija se smatra jednim od najboljih postupaka sušenja za dugotrajno očuvanje organoleptičkih svojstava namirnica, posebno prirodnih aromatskih svojstava.

Postupak liofilizacije provodi se u nekoliko koraka: zamrzavanje proizvoda te zatim dehidratacija (sublimacijom i desorpcijom). Snižavanjem temperature tekući dio uzorka prelazi u kruto stanje, a temperatura smrzavanja ovisi o prirodi proizvoda i treba biti niža od eutektične točke uzorka. Zamrzavanje se najčešće provodi u samom uređaju za liofilizaciju. Sublimacijom ili primarnim sušenjem uklanja se voda koja se nalazi u obliku leda, tzv. slobodna voda, koja uglavnom čini oko 65-90% vode u proizvodu (Liapis i Bruttini, 2014). Tijekom tog koraka, zamrznuti proizvod se u vakuumu zagrijava kako bi se dobilo dovoljno energije da se postigne sublimacija leda (Rey i May, 2010). Time se zamrznuti materijal postupno dehidratira bez zamjetnije promjene oblika, poprimajući fino poroznu strukturu. Tijekom procesa primarnog sušenja, proizvod mora ostati zamrznut i zbog toga se zagrijavanje provodi na način da se tretiranom proizvodu konstantno održava niska temperatura koja rezultira iz ravnoteže između količine dovedene topline i one potrebne za sublimaciju (Duan i sur., 2016). Desorpcija ili sekundarno sušenje provodi se nakon što je led u potpunosti uklonjen iz proizvoda. U ovoj fazi uklanja se preostali dio tzv. vezane vode (oko 10-35%) u proizvodu, odnosno ona voda koja se nije kristalizirala u obliku leda. Vezana voda uklanja se zagrijavanjem na temperaturu iznad nule pod vakuumom. Za proizvode koji su osjetljivi na povišenu temperaturu proizvod se obično zagrijava na 10-35°C, a za manje osjetljive proizvode na 50°C ili više (Liapis i Bruttini, 2014). Trajanje primare faze sušenja relativno je lako odrediti budući da ona nastupa potpunim uklanjanjem leda iz proizvoda, međutim to nije slučaj sa sekundarnom fazom. Proces desorpcije je kontinuiran i s fizikalnog stajališta nema završne točke, stoga se za svaki proizvod postiže odgovarajuća preostala vlaga pod određenom temperaturom i tlakom. Skladištenje liofiliziranog proizvoda provodi se s obzirom na specifičnosti proizvoda, a najčešće pri sobnoj temperaturi na tamnom i suhom mjestu. Dodavanjem vode liofiliziranim namirnicama obnavljaju se izvorna svojstva gotovo u potpunosti identična onima u svježem stanju.

2.3.1.2. Primjena u prehrambenoj industriji

Uz rastuću urbanizaciju i sve veću populaciju zaposlenih žena, potražnja za prerađenom hranom na tržištu sve je više u porastu. Prema istraživanju agencije Mordor Intelligence (2018) najveći segment na globalnom tržištu liofilizirane hrane čini liofilizirano voće, s udjelom od 53%. Istraživanja su pokazala da liofilizacija zahvaljujući sprječavanju rasta mikroorganizama

i usporavanju oksidacije lipida može značajno produljiti rok trajanja namirnica (Shofian i sur., 2011), a osim toga biološki aktivni spojevi ostaju stabilni i tijekom perioda od 6 mjeseci (Pérez-Gregorio i sur., 2011). Konzerviranje namirnica liofilizacijom ima veliku prednost u usporedbi s hlađenjem i zamrzavanjem osobito prilikom transporta budući se eliminiraju velika rashladna skladišta i transportna sredstva, a pritom je i masa namirnica značajno manja. Međutim, iako se liofilizacijom ograničava razgradnja bioaktivnih spojeva, ona je često neprikladna za sušenje određenih proizvoda ili ima premalu produktivnost i visoke operativne troškove da bi se mogla primijeniti u industriji (Morais i sur., 2018). Budući da konvencionalne metode sušenja toplim zrakom imaju vrlo negativan učinak na bioaktivne spojeve istraživanja su usmjerena na razvoj novih tehnika sušenja. Jedna od takvih metoda je kombinacija mikrovalova s liofilizacijom (*Microwave-Assisted Freeze Drying*) kojom se omogućava skraćivanje vremena sušenja (npr. za 40% u slučaju sušenja proteina bjelanjka) bez promjene prehrambene vrijednosti proizvoda (Chizoba Ekeziei sur., 2017).

2.3.1.3. Utjecaj na fenolne spojeve

Svježe voće, a posebice bobičasto, lako je kvarljivi proizvod i često se dehidrira kako bi bio dostupan potrošačima tijekom cijele godine. Utjecaj liofilizacije na udio fenolnih pojeva i antioksidacijske aktivnosti ispitivan je u usporedbi sa svježim uzorcima te su dobiveni kontradiktorani rezultati. Veći udio fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta izmjeren je u svježoj u usporedbi s liofiliziranom paprikom (Materska, 2014), dok rezultati istraživanja koje su proveli Wojdyło i sur. (2009) nisu pokazali značajnu razliku u sadržaju fenola između svježih i liofiliziranih jagoda, međutim veća antioksidacijska aktivnost bila je izmjerena u svježim jagodama. Sablani i sur. (2011) su pak u nekim uzorcima liofiliziranog bobičastog voća ustanovili značajno povećanje udjela fenola, antocijana i antioksidacijske aktivnosti u usporedbi sa svježim uzrokom. Međutim, u usporedbi s ostalim metodama dehidracije liofilizacija se pokazala kao najbolja metoda za očuvanje bioaktivnih spojeva i općenito nutritivne vrijednosti namirnica. Istraživanja su pokazala da se liofilizacijom, u usporedbi s metodom sušenja toplim zrakom, postiže veća retencija fenola u malini i borovnici (Sablani i sur., 2011) te kupini, jagodi i kukuruzu (Asami i sur., 2003), a osim toga da sušenje vrućim zrakom uzrokuje značajno smanjenje udjela fenola, antocijana kao i antioksidacijske aktivnosti. Ispitujući utjecaj čuvanja svježih kupina u hladnjaku i nekoliko metoda obrade (zamrzavanje, liofilizacija, sušenje toplim zrakom, konzerviranje i kuhanje džema) Wu i sur. (2010) zaključili su da je liofilizacija najbolja metoda za očuvanje bioaktivnih spojeva i

antioksidacijskog kapaciteta kupina. Veći udio fenolnih spojeva u liofiliziranoj kupini pripisali su većoj poroznosti uzorka a time i učinkovitosti tijekom ekstrakcije. I druga istraživanja potvrdila su veću antioksidacijsku aktivnost uzoraka nakon liofilizacije u odnosu na druge metode sušenja (Mejía-Meza i sur., 2008; Orphanides i sur., 2013).

2.3.2. Ultrazvuk visokog intenziteta

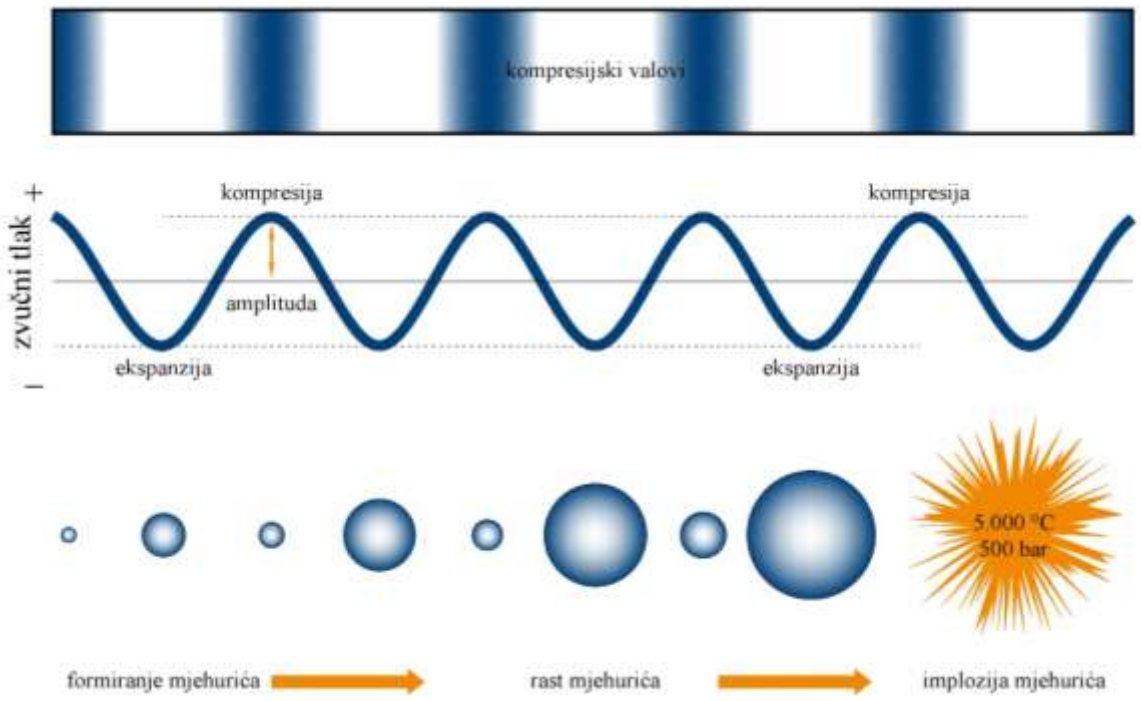
Prehrambena industrija danas je sve više usmjerena na razvoj tehnika minimalnog procesiranja hrane koje bi mogle zamijeniti konvencionalne metode konzerviranja, koje su trenutačno u primjeni. U nove postupke obrade hrane, osim ultrazvuka, ubrajaju se i visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje i elektromagnetsko zračenje, a svim spomenutim postupcima obrade zajedničko je kratko vrijeme obrade te tretiranje materijala na sobnoj temperaturi uz neznatno povišenje temperature kao posljedica obrade (Barba i sur., 2017).

Pod ultrazvukom se podrazumijeva zvučni val s frekvencijama od 18 kHz do 10 MHz, što je iznad praga osjetljivosti ljudskog sluha (16 Hz do 18 kHz). Područje ultrazvuka može se podijeliti na: ultrazvuk niskog intenziteta ili dijagnostički ultrazvuk, frekvencije 2-10 MHz, koji ne uzrokuje fizičke i kemijske promjene u svojstvima materijala kroz koji prolazi val; te ultrazvuk visokog intenziteta, frekvencije 20 kHz do 2 MHz, koji uzrokuje fizikalni raspad materijala te određene kemijske promjene u materijalima na kojima je primijenjen (Režek Jambrak i sur., 2016). Ultrazvuk visokog intenziteta našao je svoju primjenu u obradi hrane budući da može uzrokovati ubrzavanje određenih kemijskih reakcija, poboljšati stvaranje emulzija i disperzija, povećati učinkovitost ekstrakcije te uzrokovati uništenje enzima i mikroorganizama (Režek Jambrak i Vukušić, 2016).

2.3.2.1. Mehanizam djelovanja

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine: pokretanjem tekućine, mlazom plina ili najčešće pomoću električne snage. Ultrazvučni pretvarač pretvara električnu energiju u energiju zvuka, a najčešće su u primjeni pizoelektrični pretvarači. Piezoelektrični materijali, kao na primjer barijev titanat, šire se i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju te na taj način stvaraju ultrazvučne valove koji se sondom emitiraju u medij (Režek Jambrak i sur., 2010). Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do generiranja longitudinalnih valova pri čemu se stvaraju područja promjenjivih kompresija i ekspanzija

tlaka. Pritom dolazi do formiranja milijuna malih mjehurića koji se šire pod utjecajem negativnog tlaka, a zatim implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Proces koji uključuje stvaranje, rast i nagli raspad malih mjehurića koji uzrokuju jaka mikrostrujanja u tekućem mediju kao udarni valovi, zove se kavitacija. Intenzitet tih šok valova ovisi o karakteristikama tretirane tekućine, početnoj veličini mjehurića i primijenjenoj frekvenciji. Formiranje mjehurića čiji promjer neznatno oscilira tijekom primjene tlaka naziva se „stabilna kavitacija“ (Slika 8). Uslijed uzastopnih ekspanzija i kompresija mjehurića, dodirna površina im postaje sve veća te im se veličina povećava. Postizanjem kritične veličine, u sljedećem ciklusu kompresije, para kondenzira a mjehurići implodiraju. Molekule oko mjehurića snažno se sudaraju međusobno, stvarajući mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom i tlakom, a taj je fenomen zove se „kratkotrajna ili prijelazna kavitacija“ (Režek Jambrak i sur., 2016).



Slika 8. Princip ultrazvučne kavitacije (Johansson i sur., 2017)

Kolaps formiranih mjehurića rezultira stvaranjem intenzivnih valova, koji mogu uzrokovati fizikalno-kemijske promjene u strukturi tretiranog materijala kao što je pucanje

vodikovih veza i Van der Waals-ovih interakcija te dezintegracija častica, makromolekula i staničnih djelova (Terefe i sur., 2016). Najvažniji čimbenik za stvaranje kavitacije je frekvencija ultrazvuka budući da se kod visokih frekvencija (>1 MHz) kavitacija vrlo teško postiže. Osim toga stvaranje kavitacije ovisi i o viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti medija, prisutnosti otopljenih plinova te temperaturi medija (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

2.3.2.2. Primjena u prehrambenoj industriji

Ultrazvuk visokog intenziteta ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. U kombinaciji s blagim povećanjem temperature može se primijeniti za inaktivaciju mikroorganizama i enzima. Glavni mehanizmi odgovorni za mikrobnu inaktivaciju ultrazvukom visokog intenziteta su mehaničke sile generirane akustičnom kavitacijom i kemijski učinci uslijed stvaranja slobodnih radikala nastalih razgradnjom vode unutar oscilirajućeg mjehurića (Režek Jambrak i sur., 2016). Formirani intenzivni valovi mogu biti dovoljno jaki da mehanički oslabe staničnu stijenku čime dolazi do njene rupture i oslobađanja međustaničnog sadržaja (sonoporacije), a što dovodi do smrti stanica (Arroyo i Lyng, 2017). Inaktivacija enzima ultrazvukom zahtjeva indukciju strukturnog oštećenja proteina, a ovisno o enzimu koji se tretira rezultirajući učinci mogu uključivati cijepanje polimernih globularnih proteina u podjedinice, cijepanje polipeptida na fragmente, uklanjanje cikličkih aminokiselina i oksidaciju aromatskih ostataka (Arroyo i Lyng, 2017). Jedna od najranijih upotreba ultrazvuka u procesiranju hrane bila je formiranje emulzija. Kolaps mjehurića blizu fazne granice dviju tekućina koje se ne miješaju stvara val koji može osigurati učinkovito miješanje slojeva (Terefe i sur., 2016). Ultrazvuk se također koristi u preradi hrane kako bi se poboljšale operacije kao što su filtriranje, pjenjenje, kuhanje, otplinjavanje, rezanje, sušenje, omekšavanje mesa, homogenizacija i kristalizacija (Chemat i sur., 2011). Ultrazvuk se vrlo često primjenjuje kao predtretman sušenju voća i povrća čime se skraćuje vrijeme sušenja te se postižu bolja rehidracijska svojstva. Pokazalo se i da ultrazvuk može poboljšati proces zamrzavanja stvaranjem centara kristalizacije budući da veliki broj nastalih kavitacijskih mjehurića može djelovati kao male kristalne jezgre. Osim toga, ultrazvuk povećava brzinu prijenosa topline i mase tijekom zamrzavanja hrane čime se ubrzava rast kristala leda (Baoguo i sur., 2017). Ekstrakcija bioaktivnih spojeva potpomognuta ultrazvukom često se primjenjuje kako bi se osigurao bolji prinos željenih spojeva, povećana stopa ekstrakcije te smanjenje vremena trajanja procesa. Uslijed kavitacije dolazi do pucanja staničnih stjenki čime se omogućuje veće

prodiranje otapala u materijal te se poboljšava transfer mase. Time se ekstrakcija ubrzava i povećava se njena efikasnost (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

2.3.2.3. Utjecaj na fenolne spojeva

Primjenom ultrazvuka visokog intenziteta može se skratiti trajanje procesa proizvodnje čime se postiže ušteda energije, a pritom ne dolazi do promjene senzorskih svojstava namirnice te je utjecaj na nutritivne i bioaktivne komponente minimalan (Golmohamadi i sur., 2013; Režek Jambrak i sur., 2017). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom poboljšava ekstrakciju bioaktivnih spojeva za 6 do 35% u usporedbi s konvencionalnim postupcima ekstrakcije (Vilkhu i sur., 2008). Nije zabilježen negativan učinak na razgradnju fenolnih spojeva niti na antioksidacijski kapacitet soka kupine nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (Wong i sur., 2010). S druge strane, povećanje sadržaja flavonoida zabilježeno je u soku naranče (Guerrouj i sur., 2016), ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta u kaši jagode (Cheng i sur., 2014) kao i ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta u soku grejpa (Aadil i sur., 2013). Ovaj pozitivan učinak ultrazvuka pripisuje se već spomenutom mehaničkom oštećenju stanica i posljedičnom oslobađanju bioaktivnih spojeva tijekom obrade. Kao posljedica toga, stabilnost ili povećanje antioksidacijskog kapaciteta voća može se pripisati većoj retenciji ili većoj dostupnosti bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem. Uklanjanje kisika iz soka tijekom tretmana dodatno doprinosi većoj stabilnosti bioaktivnih spojeva tijekom skladištenja (Knorr i sur., 2004). Negativan učinak primjene ultrazvuka je proizvodnja slobodnih radikala, stoga je nužno optimirati uvjete obrade kako bi se smanjilo vrijeme tretiranja i mogućnost stvaranja slobodnih radikala čime se u konačnici smanjuje negativan učinak na proizvod (Režek Jambrak i sur., 2019).

Antocijani su vrlo nestabilni spojevi i imaju tendenciju brze razgradnje, ne samo tijekom obrade hrane nego i tijekom ekstrakcije. Učinci razine amplitude i vremena tretiranja pokazuju da više razine amplitude i vremena tretiranja imaju nepovoljne učinke na sadržaj antocijana u soku od grožđa (Tiwari i sur., 2010). Međutim, primjenom viših razina amplitude prilikom ultrazvučne obrade soka jagode utvrđena je degradacija manja od 5% (Tiwari i sur., 2008). Primjenom optimalnih uvjeta tretmana ultrazvukom moguće je postići manju degradaciju antocijana i time povećati ukupan antioksidacijski potencijal soka od jagode (Dubrović i sur., 2011). Zbog spomenutih prednosti ultrazvuk se u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, smatra učinkovitijom i ekonomičnijom tehnikom za ekstrakciju antocijana s minimalnom razgradnjom tijekom tretmana (Moses i sur., 2017).

2.4. *In vitro* modeli za ispitivanje probave fitokemikalija

Interakcija hrane s ljudskim tijelom je iznimno složena. Uključuje različite fizikalno-kemijske i fiziološke procese koji ovise o sastavu, svojstvima i strukturi hrane, karakteristikama pojedinca koji konzumira hranu i raznim drugim čimbenicima kao što su vrijeme konzumacije i sastav prethodno konzumirane hrane (Sensoy, 2014). Biološka svojstva fitokemikalija u ljudskom tijelu uvelike su određena njihovom biodostupnošću. Najzastupljenije fitokemikalije u našoj prehrani nisu nužno one koje mogu rezultirati najvišim tkivnim koncentracijama ili one s najjačim biološkim učincima, zbog značajnih razlika u biodostupnosti (Manach i sur., 2005). Matriks hrane je jedan od najvažnijih čimbenika koji može utjecati na oslobađanje i kinetiku apsorpcije nekih komponenti u probavnom traktu. Frakcija polifenola koja se oslobađa iz matriksa hrane djelovanjem probavnih enzima u tankom crijevu ili bakterijske mikroflore u debelom crijevu je biodostupna i stoga potencijalno bioraspoloživa (Saura-Calixto i sur., 2007). Bioraspoloživost se definira kao apsorbirana frakcija dostupna za fiziološke funkcije i pohranu u tijelu (Sensoy, 2014). Za neke spojeve koji se teško oslobađaju i slabo otapaju, kao što su karotenoidi, ili koji se razgrađuju prije dostizanja mjesta apsorpcije, kao što su antocijani, biodostupnost može biti i manja od 10% (Alminger i sur., 2014). Stoga, razumijevanje promjena koje se događaju tijekom probave (kao što su mehaničko djelovanje, enzimske aktivnosti i promijene pH) ključno je za razumijevanje biodostupnosti i procjenu bioraspoloživosti ali i bioaktivnosti, jer će samo biološki dostupne fitokemikalije u potpunosti iskoristiti svoje potencijalne korisne učinke. Budući da su *in vivo* istraživanja na životinjama i ljudima dugotrajna i skupa za provođenje, te su ograničena zbog etičkih razloga, razvijeni su *in vitro* modeli koji omogućuju predviđanje fitokemijskih promjena tijekom oralne i gastrointestinalne probave. To je omogućilo pregled relativno velikog broja uzoraka i uvjeta, proučavajući odvojene i kombinirane učinke svake faze probave na oslobađanje i dostupnost fitokemikalija, što bi teško bilo moguće *in vivo* (Alminger i sur., 2014). Glavna prepreka u interpretaciji biodostupnosti fitokemikalija na temelju *in vitro* studija je velik broj objavljenih modela od opisa prvog modela razvijenog za proučavanje biodostupnosti željeza (Miller i sur., 1981). Raznolikost modela otežala je usporedbu rezultata među studijama i povećala vjerojatnost za pojavu kontradiktornih rezultata. Primijenjeni modeli uglavnom se razlikuju u uključivanju različitih faza probave (oralna, želučana, tanko crijevo i debelo crijevo), vremena probave, pH vrijednosti, karakteristike korištenih probavnih enzima, koncentracije elektrolita i žučnih kiselina (Alminger i sur., 2014).

2.4.1. Otpuštanje fenola iz matriksa hrane tijekom gastrointestinalne probave

Kao što je spomenuto jedan od ključnih čimbenika koji utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva je matriks hrane koji može odrediti interakcije s drugim molekulama iz hrane. Fenolni spojevi s velikim brojem hidroksilnih grupa imaju visoki afinitet za vezanje na proteine što može imati utjecaj na smanjenje njihove bioraspoloživost (Karaś i sur., 2016). Takav učinak uočen je u *in vitro* istraživanju o biodostupnosti fenolnih spojeva iz voćnih sokova s dodatkom proteina iz sojinog mlijeka (Rodríguez-Roque i sur., 2015). Brojne *in vitro* studije istraživale su interakcije fenola s ugljikohidratima, osobito s prehrambenim vlaknima. Fenolni spojevi mogu se vodikovim vezama ili kovalentno vezati s komponentama stanične stjenke, kao što su pektin ili celuloza što može negativno utjecati na njihovu bioraspoloživost (Jakobek, 2015). Neka istraživanja pokazala su da se stvaranjem kompleksa s prehrambenim vlaknima bioraspoloživost fenola smanjuje, dok su na primjer Velderrain-Rodríguez i sur. (2016) ustanovili da prehrambena vlakna u mangu, papaji i ananasu nisu bila ograničavajući čimbenik u biodostupnosti fenolnih spojeva tijekom *in vitro* probave. Jakobek (2015) stoga navodi da bioraspoloživost fenola u hrani bogatoj ugljikohidratima vjerojatno ovisi o oslobađanju tih spojeva iz kompleksa, što je određeno različitim čimbenicima, kao primjerice strukturom fenola, složenošću interakcije između fenola i ugljikohidrata te aktivnosti enzima. Bohn (2014) zaključuje da iako prisutnost prehrambenih vlakana može smanjiti bioraspoloživost fenola, jer zbog povećanja viskoznosti i mase hrane tijekom probave fenoli ostaju „zarobljeni“, njihova fermentacija u debelom crijevu može utjecati na profil formiranih fenolnih metabolita.

Unutar matriksa hrane fenolni spojevi su uglavnom povezani s ugljikohidratima, organskim kiselinama ili međusobno. Antocijani i proantocijani smješteni su u vakuolama, dok flavonoidi mogu ostati u citosolu unutar endoplazmatskog retikuluma gdje se sintetiziraju (Bohn, 2014). Stoga je za oslobađanje i kasniju bioraspoloživost fenola, od presudne važnosti pucanje stanične stjenke i unutar-staničnih struktura te cijepanje od ugljikohidrata.

Probava hrane započinje u usnoj šupljini pri čemu se oslobađa enzim amilaza. Zbog kratkog vremena interakcije pretpostavlja se da je utjecaj amilaze na oslobađanje fenola nizak (Laurent i sur., 2007). Najvažniji dio probave u ustima je usitnjavanje hrane što omogućuje bolji pristup enzimima u daljnjim fazama probave. Najveći udio fenola oslobađa se tijekom probave u želucu. Na primjer, oko 65% ukupne količine fenola i flavonoida oslobađa se tijekom probave jabuke u želucu, a daljnjih 10% tijekom probave u tankom crijevu (Bouayed i sur., 2011). Slično tome Tagliazucchi i sur. (2010) ustanovili su da se oko 60% ukupne količine fenola oslobađa se tijekom probave grožđa u želucu, dok se tijekom probave u tankom crijevu

daljnje oslobodilo manje od 2%. U želučanoj fazi probava pepsinom u kombinaciji s peristaltičkim poketima i niskim pH (oko 3) rezultira daljnjim usitnjavanjem hrane. Osim toga, pri niskom pH fenolni spojevi su u nedisociranom obliku što može potaknuti prijelaz/difuziju iz matriksa hrane u vodenu fazu zbog smanjenih ionskih interakcija (Bohn, 2014). Prelaskom hrane iz želuca u tanko crijevo dolazi do povećanja pH vrijednosti (oko 7-8) što omogućuje aktivaciju enzima gušterače i tankog crijeva uključujući fosfolipaze, amilaze, karboksipeptidaze, tripsinogen, kimotripsinogen, lipaze i žučne soli pri čemu lipaze i žučne soli imaju najznačajniju ulogu u probavi nepolarnih spojeva kao što su masti, nepolarni mikronutrijenti i fitokemikalije što rezultira stvaranjem miješanih micela topljivih u vodi. Nepolarni flavonoidi također se mogu micelarizirati što će rezultirati niskom biodostupnošću (Bohn, 2014). Povećanje pH vrijednosti u tankom crijevu najznačajniji negativan utjecaj ima na antocijane koji tvore bezbojne halkone te se razgrađuju otvaranjem C prstena (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Više istraživanja pokazalo je da se antocijani uglavnom degradiraju u tankom crijevu što rezultira vrlo niskom bioraspoloživošću (koncentracija u serumu < 1%) (Tagliazucchi i sur. 2010; Correa-Betanzo i sur., 2014; Ariza i sur., 2017). Međutim, Czank i sur. (2013) su korištenjem izotopski obilježenog cijanidin-3-glukozida dokazali prisutnost raznih cirkulirajućih metabolita u krvi, urinu, izdahu i stolici te time i značajno veću bioraspoloživost antocijana (> 12%). Podsedek i sur. (2014) u svom istraživanju zaključuju da komponente crvenog kupusa štite labilne antocijane tijekom *in vitro* probave čime su potvrdili važan utjecaj matriksa hrane na stabilnost fenolnih spojeva.

Procjenjuje se da se oko 80% flavonoida unosi putem hrane u obliku glikozida (Pérez-Jiménez i sur., 2011), a budući da se većina fenola apsorbira u obliku aglikona, neophodno je odvajanje od šećerne skupine što se odvija djelovanjem laktaze-florizin hidrolaze (LPH) na tzv. četkastoj granici (*brush border*) epitelnih stanica tankog crijeva. Cijepanjem na aglikone fenole mogu apsorbirati enterociti tankog ili debelog crijeva pasivnom difuzijom (Bohn, 2014). Bakterije crijevne mikrobiote mogu sudjelovati u metabolizmu fenola a uobičajene reakcije uključuju deglikozilaciju, dehidroksilaciju, demetilaciju, dekonjugaciju, epimerizaciju, cijepanje prstena (obično C-prstena), hidrolizu i reakcije skraćivanja lanca (Bohn, 2014). Opseg metabolizma može značajno varirati zbog razlika u sastavu mikrobiote ali i matriksa hrane. Na primjer, poznato je da fenoli mogu djelovati kao inhibitori probavnih enzima (Kim i sur., 2016; Buchholz i Melzig, 2015) te stoga visoke koncentracije fenola mogu smanjiti razgradnju lipida i ugljikohidrata povećavajući volumen neprobavljene hrane i time povećati udio fenola koji prelaze u debelo crijevo. Debelo crijevo najznačajnije je mjesto biodostupnosti proantocijanidina budući ih se oko 95% otpušta djelovanjem crijevne mikrobiote (Saura-

Calixto i sur., 2007). Iako mikrobiološka fermentacija smanjuje bioraspoloživost nativnih fenola, ona dovodi do stvaranja metabolita koji mogu imati i veću biološku aktivnosti u odnosu na nativne oblike (Karaś i sur., 2016).

2.4.2. Primjena humanih enzima u *in vitro* modelu probave hrane

Izazov u svim *in vitro* modelima probave predstavlja simulacija fizioloških parametara kao što su varijacije u izlučivanju enzima, kiselina i žučnih soli; dostupnost supstrata i vrijeme prolaska hrane kroz želudac i dvanaesnik. U većini studija primjenjuju se pročišćeni, komercijalni enzimi životinjskog podrijetla, ali njihova uloga u simulaciji procesa probave još uvijek je dvojbena i nedovoljno istražena. Korištenje humanih probavnih sokova predstavlja veliku prednost u odnosu na komercijalne probavne enzime jer su humani probavni sokovi kompleksna smjesa koja sadrži različite enzime, inhibitore enzima i žučne soli koje zajedno doprinose procesu probave hrane (Furlund i sur., 2013). Na primjer, Macierzanka i sur. (2009) pokazali su da fosfolipidi prisutni u gastrointestinalnom traktu utječu na *in vitro* probavu bjelančevina β-kazeina i β-laktoglobulina. Takvi fosfolipidi su rijetko prisutni prilikom izvođenja *in vitro* probave uporabom jednostavnih komercijalnih enzima ali mogu biti dio gastrointestinalnih sokova. U humanim želučanim sokovima detektirane su sljedeće komponente: pepsin, tripsin, gastricin, žuč, mali peptidi i fragmenti proteina, a u soku dvanaesnika enzime crijeva i gušterače kao što su proteolitički enzimi, lipaze, enterokinaze, tripsinogen, kimotripsinogen i amilaze (Zorić i sur., 2016).

In vitro istraživanja koja su se provodila uz korištenje humanih probavnih enzima vrlo su rijetka te se najčešće provode na mliječnim proteinima. U istraživanju koje su proveli Eriksen i sur. (2010) ustanovili su da je prilikom *in vitro* probave kozjih proteina sirutke životinjski pepsin bio efikasniji u odnosu na korištene humane želučane sokove, međutim u humanim želučanim sokovima ustanovili su prisutnost različitih izoformi pepsina, Pepsin A čini oko 90% dok je 10% proteaza u humanom želučanom soku pronađeno kao pepsin C te zaključuju da dodatne izoforme pepsina prisutne u humanim želučanim sokovima mogu biti manje učinkoviti u razgradnji bjelančevina u odnosu na životinjski pepsin A ili mogu imati različite pH optimume (Eriksen i sur., 2010). Aalmas i sur. (2006) ustanovili su da se komercijalnim pepsinom, tripsinom i kimotripsinom iz svinja, u usporedbi s korištenim humanim probavnim sokovima, dobivaju različiti peptidni profili nakon hidrolize mlijeka. Slično tome, Furlund i sur. (2013) zaključuju da raznolikost enzima u humanom

gastrointestinalnom sustavu utječe na hidrolizu laktoferina mlijeka generirajući različite peptidne fragmente u usporedbi s onima dobivenim upotrebom samo jedne ili nekoliko proteaza životinjskog podrijetla. Nedavno je objavljeno i istraživanje u kojem je, uz primjenu humanih probavnih sokova, ispitana gastrointestinalna stabilnost karotenoida u svježem i liofiliziranom povrću (Bilušić i sur., 2019).

2.5. Inkapsulacija fenolnih spojeva

Osjetljivost fenolnih spojeva na okolišne uvjete, uvjete procesiranja hrane i/ili uvjete u gastrointestinalnom sustavu čovjeka uvelike ograničava njihove potencijalno pogodne učinke na zdravlje u pogledu prevencije razvoja kroničnih bolesti. Upotrebom tehnika inkapsulacije bioaktivnih spojeva unutar određenih materijala može se poboljšati stabilnost i produljiti njihova biološka aktivnost. Inkapsulacija se može definirati i kao tehnika „pakiranja“ čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala u male kapsule koje otpuštaju inkapsulirani sadržaj kontroliranom brzinom i u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Glavni cilj inkapsulacije je zaštita inkapsuliranog materijala od nepovoljnih okolišnih uvjeta (svjetla, vlage, kisika) kao i njegovo kontrolirano otpuštanje (Fang i Bhandari, 2010). Do danas je opisana upotreba različitih tehnika za inkapsulaciju (sušenje raspršivanjem, koacervacija, emulzije, liposomi, micele, nanočestice, liofilizacija, ko-kristalizacija) u kombinaciji s fenolnim ekstraktima ili čistim fenolnim spojevima (Đorđević i sur., 2015; Drvenica i sur., 2017). Upotreba emulzija smatra se jednim od najperspektivnijih i najbrže razvijajućih alata u prehrambenoj industriji i to zbog njihove visoke učinkovitosti inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti ciljanog spoja i njegovog kontroliranog oslobađanja (Lu i sur., 2016). Liposomi su također zanimljivi sustavi za inkapsuliranje, čija je primjena široko rasprostranjena u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

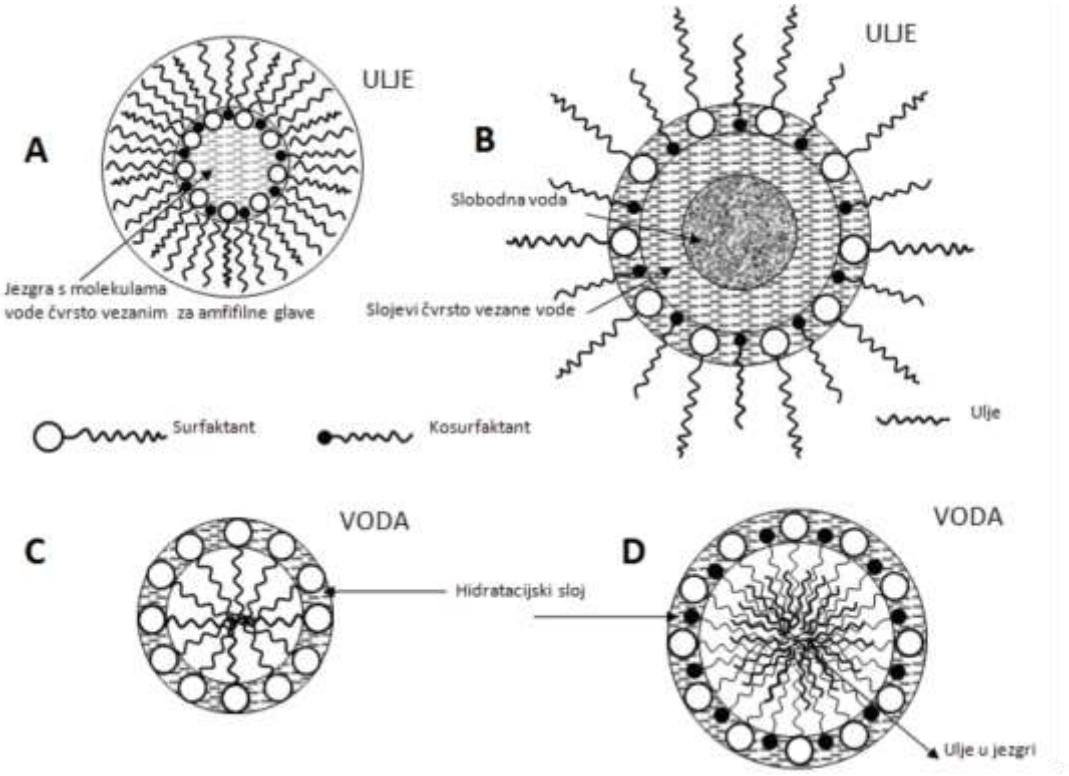
2.5.1. Primjena mikroemulzijskih sustava

Emulzije se sastoje od dviju međusobno nemješljivih tekućina, najčešće ulja i vode, pri čemu je jedna tekućina (disperzna faza) raspršena u obliku malih sferičnih kapljica u drugoj (kontinuirana faza). Emulzije se mogu klasificirati prema relativnoj prostornoj distribuciji uljne i vodene faze. Sustav koji se sastoji od uljnih kapljica raspršenih u vodenoj fazi naziva se emulzija ulje-u-vodi (U/V), npr. mlijeko; dok se sustav koji se sastoji od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi naziva emulzija voda-u-ulju (V/U), npr. maslac (Lu i sur., 2016). Postupak konverzije dviju odvojenih tekućina koje se ne miješaju u emulziju, ili smanjenje veličine kapljica u postojećoj emulziji poznat je kao homogenizacija te se u prehrambenoj industriji provodi homogenizatorima (McClements, 2012). Priprema sustava emulzije iz dvije odvojene tekućine se smatra primarnom homogenizacijom, dok se redukcija veličine kapljica u već postojećim emulzijama definira kao sekundarna homogenizacija. Na svojstva emulzije

(veličina kapljica, stabilnost i viskoznost) uvelike utječu uvjeti pod kojima se odvija homogenizacija, uključujući temperaturu, tlak i cikluse, stoga se kontroliranim uvjetima mogu dobiti emulzije s poželjnim svojstvima za ciljanu inkapsulaciju i otpuštanje fenolnih spojeva (Lu i sur., 2016). Kontakt između ulja i vode u emulziji je termodinamički nepovoljan zbog velike površinske napetosti između faza, a može se smanjiti dodatkom tzv. stabilizatora, odnosno emulgatora. Većina emulgatora su amfifilne molekule, a u prehrambenoj industriji su najčešće u primjeni fosfolipidi, polisaharidi i surfaktanti (površinski aktivne tvari) (McClements, 2016).

Kod većine emulzija prosječni promjer kapljica iznosi od 100 nm do 100 μm. Ako je prosječni promjer kapljica manji od 100 nm, te se emulzije nazivaju mikroemulzije, a prema IUPAC-u (engl. International Union for Pure and Applied Chemistry) se definiraju kao disperzije sačinjene od ulja, vode i surfaktanata te predstavljaju sustav koji je termodinamički stabilan i optički izotropan s kapljicama veličine od 1 nm do 100 nm (najčešće od 10 nm do 50 nm) (Slomkowski i sur., 2011). Po unutrašnjoj strukturi mikroemulzija može sadržavati kapljice ulja-u-vodi (u/v) stabilizirane međupovršinskim slojem surfaktanta (i kosurfaktanta), kapljice vode-u-ulju (v/u) ili može biti bikontinuirana faza (Jurkin i Gotić, 2013). Bikontinuirane mikroemulzije imaju približno jednaku količinu ulja i vode te sadrže dvije kontinuirane faze koje se stalno isprepleću. Mikroemulzije su samoorganizirajući sustavi koji nastaju spontano, bez utroška energije te sadrže značajno veću količinu surfaktanata u odnosu na ostale sastojke sustava. U mikroemulzijama amfifilne molekule surfaktanta potpuno obavijaju kapljice, pa disperzna i kontinuirana faza nisu u izravnom kontaktu. Iz toga razloga je međupovršinska napetost na granici faza izrazito mala (Jurkin i Gotić, 2013).

Micele su čestice koloidnih dimenzija koje se spontano formiraju u sustavu, najčešće u sferoidne strukture, iznad određene koncentracije surfaktanta, poznate kao kritična micelizacijska koncentracija. Disperzijom ulja u vodenoj fazi amfifilne molekule surfaktanta orijentiraju se prema vani, odnosno prema vodi, a hidrofobni lanci usmjereni su prema unutrašnjosti. Ako je voda dispergirana u uljnoj fazi, bit će obrnuto. U literaturi se često sferni agregati iz mikroemulzija nazivaju micelama ili inverznim micelama, iako uz određene sličnosti postoje i značajne razlike među njima. Micele i mikroemulzijski agregati pokazuju sličnu orijentaciju površinski aktivnih molekula ali, za razliku od inverznih micela, mikroemulzije tipa voda-u-ulju sadrže slobodnu vodu u središtu agregata (Jurkin i Gotić, 2013). Na Slici 9. prikazane su razlike između micela i mikroemulzijskih agregata.

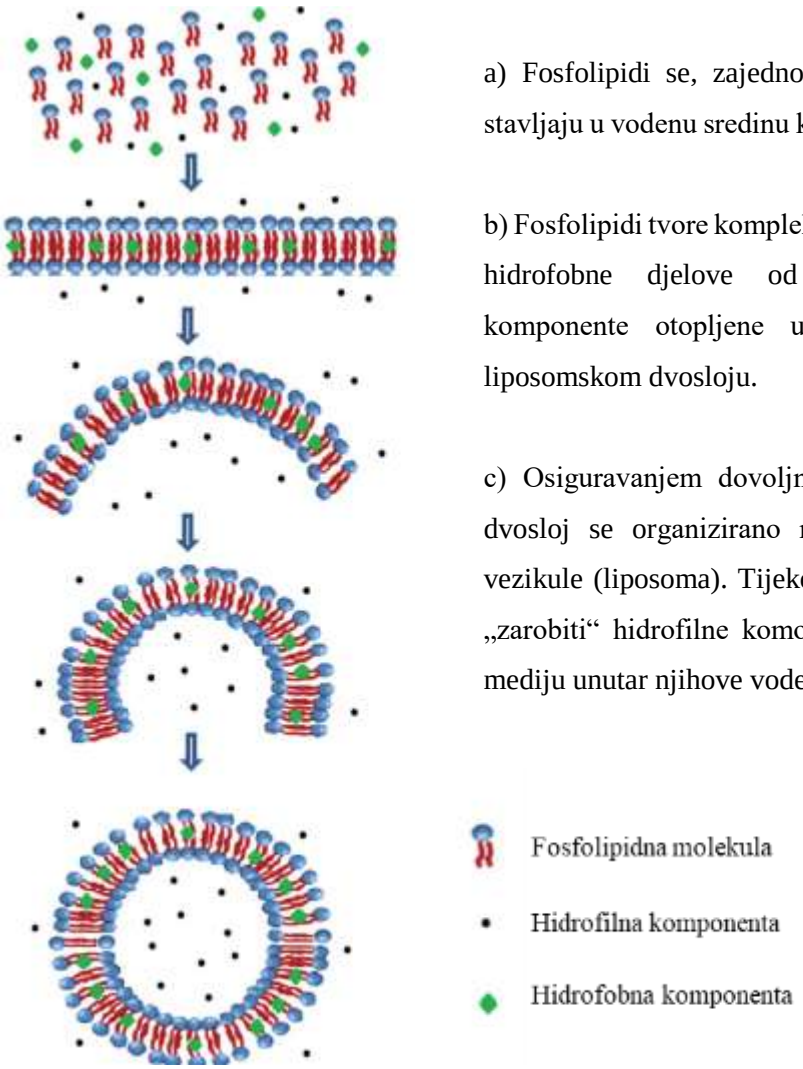


Slika 9. Razlike između micela i mikroemulzijskih agregata. A = inverzna micela; B = mikroemulzijski agregat voda-u-ulju; C = normalna micela; D = mikroemulzijski agregat ulje-u-vodi (Jurkin i Gotić, 2013).

Mikroemulzije su izuzetno pogodne u proizvodnji funkcionalne hrane budući da poboljšavaju apsorpciju, stabilnost i bioraspoloživost mnogih bioaktivnih komponenti (Xu i sur., 2017). Dosadašnja istraživanja pokazala su da se inkapsulacijom u mikroemulzije povećava topljivost inkapsuliranih derivata likopena i luteina u vodenom mediju (Amar i sur., 2003), povećava bioraspoloživost kurkumina (Xiao i sur., 2013), poboljšava antifugalna aktivnost esencijalnog ulja lovora (Xu i sur., 2017) te povećava stabilnost polifenola čaja (Yan i sur., 2018). Ru i sur. (2010) pokazali su da je epigalokatehin-3-galat (EGCG), najzastupljeniji polifenol u zelenom čaju, inkapsuliran u ulje-u-vodi emulziji pokazao poboljšani antitumorski učinak na hepatocelularnim staničnim linijama, u usporedbi sa slobodnim EGCG-om.

2.5.2. Primjena liposoma

Liposomi su koloidne, sferične čestice koje se sastoje od jednog ili više slojeva koncentrično posloženih fosfolipidnih membrana koje okružuje vodenu jezgru (Fang i Bhandari, 2010). Zbog amfifilne prirode fosfolipidnog dvosloja imaju sposobnost inkapsulacije različitih lipofilnih i hidrofilnih bioaktivnih spojeva (Emami i sur., 2016). Shematski prikaz formiranja liposoma prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz formiranja liposoma (Emami i sur., 2016).

Liposomi su inicijalno razvijeni za medicinske potrebe iz razloga što su u potpunosti fiziološki prihvatljivi zahvaljujući sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti, što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima (infektivna oboljenja, dijagnostika, hormonska terapija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija (Torchilin, 2005). Osim spomenutih posjeduju i brojne druge prednosti, uključujući industrijsku proizvodnju velikih razmjera uz korištenje prirodnih sastojaka, biokompatibilnosti, mogućnosti inkapsulacije širokog spektra bioaktivnih spojeva kao i zdravstvenih prednosti liposomskih sastojaka kao što su fosfolipidi i sfingolipidi. Liposomi stoga predstavljaju vrlo korisne sustave za isporuku pogodne za upotrebu i u prehrambenoj industriji (Emami i sur., 2016). U prehrambenoj industriji liposomi se primjenjuju kao nosači mnogih funkcionalnih spojeva, kao na primjer vitamina, enzima, eteričnih ulja, bioaktivnih peptida i fenolnih spojeva. Bioaktivni spoj inkapsuliran unutar liposoma zaštićen je od djelovanja niza okolišnih uvjeta (npr. temperatura, visoka koncentracija iona, prisutnost reaktivnih kemijskih spojeva) kao i tijekom probave u gastrointestinalnom traktu (npr. ekstremni pH uvjeti, prisutnost enzima) te pokazuje značajnu razinu apsorpcije što dovodi do povećanja bioaktivnosti i biodostupnosti (Fang i Bhandari, 2010; Emami i sur., 2016). Istraživanja su pokazala su da se inkapsulacijom u liposome povećava stabilnost vitamina C (Wechtersbach i sur., 2012) i vitamina E (Marsanasco i sur., 2011) u usporedbi s otopinama slobodnih vitamina tijekom skladištenja ili termičke obrade. Osim toga, poboljšava se antioksidacijska i antimikrobna aktivnost ekstrakta mirte (Gortzi i sur., 2008) kao i esencijalnog ulja i ekstrakta limuna (Gortzi i sur., 2007) te antifugalni učinak esencijalnog ulja eukaliptusa (Moghimipour i sur., 2012) u odnosu na njihov slobodni oblik.

Sve veći broj istraživanja ima za cilj dizajniranje liposoma koji bi omogućili veću stabilizaciju i zaštitu fenolnih spojeva, poboljšanje njihove topljivosti i bioraspoloživosti te postizanje ciljanog i/ili produljenog oslobađanja. Mnoga dosadašnja istraživanja uspješno su provela inkapsulaciju resveratrola (Isailović i sur., 2013), katehina i EGCG-a (Rashidinejad i sur., 2014) i kurkumina (Gómez-Mascaraque i sur., 2017). Takahashi i sur. (2009) navode bržu i bolju apsorpciju kurkumina inkapsuliranog u liposome u odnosu na slobodni oblik ili smjesu kurkumina i lecitina. Osim toga, isti autori potvrdili su i veću antioksidaciju aktivnost plazme nakon primjene inkapsuliranog kurkumina. Inkapsulirani resveratrol pokazao je veću učinkovitost u zaštiti stanica od djelovanja UV-B zračenja (Caddeo i sur., 2008). Poboljšana topljivost kvercetina inkapsuliranog u liposome dovela je do povećanja antitumorskog učinka kvercetina na glia-stanicama, što je objašnjeno duljim izlaganjem stanica aktivnoj tvari (Wang

i sur., 2012). Ispitivanje antitumorske aktivnosti kurkumina inkapsuliranog u liposome pokazalo je da inkapsulirani kurkumin inhibira rast karcinoma gušterače te pokazuje antiangiogene učinke (Mach i sur., 2009). Budući da omogućuju usporeno oslobađanje liposomi mogu smanjiti citotoksičnost primijenjenih bioaktivnih spojeva (npr. resveratrola) u visokim koncentracijama (Caddeo i sur., 2008; Isailović i sur., 2013).

2.6. Pregled dosadašnjih istraživanja

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corynbosum* L.) ubraja se među najbogatije izvore fenolnih spojeva po jedinici serviranja (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Odlikuje se visokim sadržajem antocijana koji su povezani sa smanjenim rizikom od hipertenzije i infarkta (Afrin i sur., 2016), preventivnim učinkom na metabolički sindrom (Basu i Lyons, 2012), blagotvornim učinkom na lipidni profil i inhibitornim učinkom na razvoj ateroskleroze (Huang i sur., 2016). Međutim, kao što je već spomenuto povoljni učinci fenolnih spojeva borovnice na zdravlje ne ovise samo o njihovom unosu već i o njihovoj stabilnosti na koju značajan utjecaj mogu imati primijenjene metode obrade nakon berbe i uvjeti tijekom skladištenja (Michalska i Łysiak, 2015). Stoga je posljednjih godina fokus mnogih znanstvenih istraživanja usmjeren na poboljšanje nutritivne vrijednosti proizvoda uz istovremeno smanjenje negativnih posljedica tijekom procesa prerade, koji su ključni za kvalitetu finalnog proizvoda od borovnice (Mejía-Meza i sur., 2008; Struck i sur., 2016; Zhu i sur., 2017).

Brojne su studije istraživale učinak ultrazvuka visokog intenziteta na voćne sokove ali vrlo malo ih je ispitivalo utjecaj na voćne kaše, npr. kašu maline (Golmohamadi i sur., 2013), kašu jagode (Cheng i sur., 2014; Sulaiman i sur. 2017), voćni smoothie (Keenan i sur., 2012), a niti jedna studija do sada nije ispitivala utjecaj na kašu kultivirane borovnice. Iako je utjecaj pasterizacije (Brownmiller i sur., 2008) i liofilizacije (Sablani i sur., 2011) na fenolne spojeve borovnice već istražen niti jedno istraživanja do sada nije pratilo utjecaj ovih metoda obrade na stabilnost fenolnih spojeva tijekom *in vitro* probave. Dalmau i sur. (2017) pratili su utjecaj liofilizacije na fenolne spojeve jabuke tijekom *in vitro* probave u želucu, a Cassani i sur. (2018) ispitali su stabilnost fenolnih spojeva soka od jagode tretiranog ultrazvukom nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu, međutim, do sada niti jedno istraživanje nije pratilo stabilnost fenolnih spojeva borovnice tijekom *in vitro* probave uz primjenu humanih enzima.

Unatoč prednostima koje proizlaze iz literature o zaštiti fenola inkapsulacijom (Lu i sur., 2016; Drvenica i sur., 2017), nedostaje takvih studija provedenih na plodovima borovnice.

Osim toga, primjena inkapsuliranih ekstrakata kultivirane borovnice na produljenje oksidacijske stabilnosti jestivih ulja do sada nije istražena.

Na temelju prethodno navedenog te uzimajući u obzir činjenicu da su utjecaji metoda obrade na fenolne spojeve borovnice te njezinu biološku aktivnost i stabilnost znanstveno nedovoljno istraženi, cilj ovog rade je odrediti utjecaj liofilizacije, pasterizacije i ultrazvuka visokog intenziteta na fenolni profil te biološku aktivnost i *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost fenola kultivirane borovnice. Dobiveni rezultati dodatno će proširiti znanstvene spoznaje o biološkoj aktivnosti i stabilnost fenolnih spojeva borovnice čime se značajno povećavaju mogućnosti primjene ove nutritivno visoko vrijedne namirnice.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U radu su korišteni svježi plodovi kultivirane borovnice *Vacciunium corymbosum* L, pribavljeni u lokalnoj trgovini u Splitu. Dio borovnica izdvojen je za potrebe određivanja udjela suhe tvari i liofilizacije (uzorak AL), a ostatak je homogeniziran u kašu pomoću miksera. Jedan dio pripravljene kaše plodova borovnice zamrznut je na temperaturi od – 20 °C kao netretirani uzorak (A0), a preostali dio je pasteriziran (uzorak AP) te obrađen tehnikom ultrazvuka visokog intenziteta (uzorci A1-A11; Tablica 4).

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje udjela vode i suhe tvari

Udio vode i suhe tvari određen je gravimetrijski prema AOAC 930.04 metodi sušenjem uzorka u laboratorijskom sušioniku (Memmert, UF30, Schwabach, Njemačka) na temperaturi od 105 °C do konstantne mase (Helrich, 1990).

3.2.2. Metode obrade uzoraka borovnice

3.2.2.1. Liofilizacija borovnica

Liofilizacija borovnica provedena je u liofilizatoru (Labconco, Kansas City, SAD) na temperaturi od – 55 °C. Liofilizirane borovnice homogenizirane su u mlincu (Bosch, MKM6000, Stuttgart, Njemačka) do strukture finog praha i čuvane na suhom i tamnom mjestu, na temperaturi nižoj od 20 °C.

3.2.2.2. Pasterizacija kaše borovnice

Pasterizacija kaše borovnice (100 mL) provedena je u laboratorijskom sušioniku (Memmert, UF30, Schwabach, Njemačka) na temperaturi od 85 °C kroz period od 5 minuta nakon čega je uzorak ohlađen u hladnoj vodi i zamrznut na temperaturi od – 20 °C.

3.2.2.3. Tretman kaše borovnice ultrazvukom visokog intenziteta

Tretman kaše borovnice ultrazvukom visokog intenziteta proveden je upotrebom uređaja SONICATOR S-400 (Misonix Sonicators, Newtown, CT, SAD) pri čemu je korištena sonda promjera 19,1 mm pri frekvenciji od 20 kHz. Volumen tretiranog uzorka bio je 100 mL, a uzorci su tretirani tijekom perioda od 3, 6 i 9 minuta te pri amplitudama od 50, 75 i 100% (30, 45 i 60 μm). Eksperiment tretiranja kaše borovnice dizajniran je u STATGRAPHICS Centurion (Stat Point Technologies, Inc., Warrenton, VA, SAD) programu koristeći *Multi-Factor Categorical Design*. Eksperiment se sastojao od 11 tretiranja i jedan od njih se ponovio kako bi se dobila dobra procjena eksperimentalne pogreške (Tablica 4). Ponavljanje eksperimenata provodi se nakon drugih eksperimenata, prema redoslijedu koji je dizajnirao program. Nakon svih tretmana uzroci su zamrznuti na temperaturi od – 20 °C.

Tablica 4. Eksperimentalni dizajn ultrazvučnog tretmana

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	Intenzitet (W cm^{-2})
A1	100	6	60	20,95
A2	50	6	37	12,92
A3	50	9	30	10,46
A4	100	9	52	18,16
A5	75	6	45	15,71
A6	50	3	45	15,71
A7	75	6	48	16,76
A8	75	3	57	19,90
A9	100	3	70	24,44
A10	75	6	47	16,41
A11	75	9	42	14,67

Ultrazvučna snaga, koja se smatra mehaničkom energijom, dijelom se gubi u obliku topline prilikom prolaska ultrazvuka kroz medij. Budući da ultrazvučni tretman proizvodi toplinu, praćenje temperature u funkciji vremena vodi do izračunavanja aukustične snage prema izrazu (Režek Jambrak i sur., 2009):

$$P = m \cdot c_p \cdot (dT/dt) \qquad /1/$$

gdje je: m - masa tretirane tekućine (g), c_p - specifični toplinski kapacitet tretiranog uzorka kod konstantnog tlaka (kaša borovnice - 3368 J/gK), dT/dt - nagib krivulje.
Ultrazvučni intenzitet (AI) računa se prema izrazu (Dubrović i sur., 2011):

$$AI = P/A \qquad /2/$$

gdje je: P – ultrazvučna snaga (W), A – površina sonde (cm^2).

3.2.3. Određivanje fenolnih spojeva borovnice

3.2.3.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzoraka borovnice primjenom vodene otopine etanola provedena je prema metodi koju su opisali Dragović-Uzelac i sur. (2010). Za ekstrakciju je odvagano 5 g netretirane, pasterizirane i ultrazvučno tretiranih kaša borovnice te 0,5 g praha liofilizirane borovnice i dodano 20 mL 80 %-tne vodene otopine etanola (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska). Smjesa u tikvici propuhala se s dušikom i uzorak se ekstrahirao 20 minuta. Nakon ekstrakcije smjesa je profiltrirana kroz Büchnerov lijevak s filter papirom Whatman No. 40, (Whatman International Ltd., Kent, UK) u odmjernu tikvicu od 50 mL. Ekstrakcija ostatka je ponovljena i oba filtrata su spojena te je tikvica nadopunjena do oznake s vodenom otopinom etanola. Pripremljeni uzorci pohranjeni su na temperaturi od – 20 °C.

3.2.3.2. Priprema nativnih uzoraka

Nativni uzorci pripremljeni su prema metodi koju je opisala Correa Betanzo (2013). Za ekstrakciju je odvagano 2 g uzorka netretirane, pasterizirane i ultrazvučno tretiranih kaša borovnice te 0,2 g praha liofilizirane borovnice te su uzorci potom ekstrahirani s 2 mL destilirane vode tijekom perioda od 5 minuta. Uzorci su zatim centrifugirani pri broju okretaja od 1500, tijekom perioda od 5 minuta (MySPIN 12, Thermo Scientific, SAD). Supernatanti su potom izdvojeni te filtrirani preko membranskog filtera, veličine pora 0,45 μm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Pripremljeni uzorci pohranjeni su na temperaturi od – 20 °C.

3.2.3.3. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijskom tehnikom

Sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima i nativnim uzorcima određen je spektrofotometrijski primjenom Folin-Ciocalteu metode (Singleton i Rossi, 1965) koja se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline se reduciraju se u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni (Amerine i Ough, 1980). Intenzitet plavog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm.

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- otopina natrijevog karbonata, w (Na_2CO_3) = 20% : 200 g bezvodnog natrijevog karbonata (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) otopi se u 1 L vruće destilirane vode. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon toga profiltrira.
- matična otopina standarda (galne kiseline), c($C_7H_6O_5$) = 5000 mg/L (Merck, Darmstadt, Njemačka): 0,5 g prethodno osušene galne kiseline otopi se u 100 mL destilirane vode.

U kivete se doda 17 µL uzorka, 680 µL destilirane vode i 85 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute smjesi se dodaje 170 µL Na_2CO_3 i nadopuni s 748 µL destilirane vode do vrha kivete. Nakon perioda od sat vremena, na spektrofotometru (Perkin-Elmer Lambda EZ 201, Rim, Italija) izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj fenolnih spojeva računa se preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenata galne kiseline (mg GAE) na 100 g borovnice.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripravljene su otopine standarda, galne kiseline u koncentracijama od 50 do 500 mg/L, koje su ispitane prema opisanom postupku. Iz dobivenih podataka nacrta se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije standarda na apscisi i vrijednosti apsorbancije na ordinati.

Jednadžba pravca: $y = 0{,}0009x + 0{,}0034$; $R^2 = 0{,}998$. /3/

gdje je: y = apsorbancija uzorka pri 765 nm

x = ekvivalent galne kiseline (mg GAE)

3.2.3.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima i nativnim uzorcima provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) metodom koju su opisali Zorić i sur. (2014). Mjerenje je provedeno na uređaju Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) koji se sastoji od Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu, 1260 UV-Vis detektora s nizom dioda (engl. *Poly Diode-Array*, PDA). Parametri kromatografske analize prikazani su u Tablici 5., dok je program gradijentne eluacije prikazan u Tablici 6.

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 570 nm (Tomás-Barberán i sur. 2001; Šimunić i sur. 2005; Kirakosyan i sur. 2009; Mitić i sur. 2012).

Tablica 5. Uvjeti kromatografskog određivanja fenolnih spojeva

Kolona	Nucleosil 100-5C18, 5µm
Duljina kolone x unutarnji promjer	250 × 4,6 mm
Eluenti	otapalo A: 3% mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 3% mravlja kiselina u 80% acetonitrilu
Eluiranje	gradijentno; gradijent prikazan u Tablici 6.
Detektor	UV-Vis PDA
Temperatura	22 °C
Vrijeme trajanja	55 min
Injektirani volumen	5 µm
Vrijeme uravnoteženja kolone	2 min

Tablica 6. Program gradijentne eluacije kromatografskog određivanja fenolnih spojeva

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

Standardi antocijana, delfinidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-glukozid, petunidin 3-*O*-glukozid, peonidin 3-*O*-glukozid i malvidin 3-*O*-glukozid otope se u kiselom metanolu [metanol s 1% mravljom kiselinom (v/v)] tako da početna koncentracija bude 100 mg/L. Pripremljene otopine standarda se razrijede u omjeru 1:0,5, 1:1, 1:2 i 1:4 s kiselim metanolom i dobivene koncentracije iznosile su 66,67, 50, 33,33 i 20 mg/L. Dobivene otopine svakog standarda različitih koncentracija kromatografski se analiziraju tako da se injektiranje, svake pripremljene otopine pojedinačno, ponavlja 5 puta. Na temelju odnosa površine pikova očitanih pri valnoj duljini od 520 nm i koncentracija standarda nacrtani su baždarni pravci i izračunate pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard (Tablica 7).

Tablica 7. Jednadžbe baždarnih pravaca za antocijane

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent determinacije (R^2)
Delfinidin 3-*O*-glukozid	y = 19,452 x	0,995
Cijanidin 3-*O*-glukozid	y = 23,861 x	0,993
Petunidin 3-*O*-glukozid	y = 23,786 x	0,990
Peonidin 3-*O*-glukozid	y = 24,221 x	0,993
Malvidin 3-*O*-glukozid	y = 17,432 x	0,994

Standardi flavonol glikozida i fenolnih kiselina otopljeni su u 80 %-tnom etanolu. Koncentracije klorogenske i kafeinske kiseline iznosile su 52 mg/L, *p*-kumarinske 48 mg/L, galne 46 mg/L, kvercetin 3-β-glikozida 400 mg/L i kemferol 3-*O*-rutinozida 200 mg/L.

Navedene otopine pomiješane su u omjeru 1:1:1:1:1:1 te su iz dobivene smjese pripravljena još četiri razrjeđenja. Provedena je kromatografska analiza (5 puta injektiranje svake otopine) pri čemu su površine pikova za flavonol glikozide očitane pri valnoj duljini od 320 nm, a fenolne kiseline pri pri valnoj duljini od 280 nm. Iz površine pikova i masenih koncentracija spojeva nacrtani su baždarni pravci i izračunate pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard (Tablica 8).

Tablica 8. Jednadžbe baždarnih pravaca za flavonol glikozide i fenolne kiseline

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent determinacije (R^2)
Kvercetin 3-β-D-glukozid	y = 10,790 x	0,989
Kemferol 3-*O*-rutinozid	y = 10,860 x	0,999
Klorogenska kiselina	y = 14,571 x	0,992
p-kumarinska kiselina	y = 10,729 x	0,989
Kafeinska kiselina	y = 21,290 x	0,989
Galna kiselina	y = 17,441 x	0,993

3.2.4. Određivanje biološke aktivnosti

3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i nativnih uzoraka plodova borovnice primijenjene su dvije metode: DPPH metoda i FRAP metoda, dok je dodatno za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata primijenjena i Rancimat metoda.

3.2.4.1.1. DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni slobodni radikal, koji sadrži jedan nespareni elektron te postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm). Reakcija radikala s antioksidansom (AH) temelji se na doniranju atoma vodika radikalu stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Pretvorbom u neradikalni oblik dolazi do promjene boje iz ljubičastu u žutu, odnosno smanjenja apsorbancije koja je proporcionalna koncentraciji i antioksidacijskoj aktivnosti uzorka (Prior i sur., 2005).

Reagensi:

- 0,02 g DPPH radikala ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka) otopi se u 100%-tnom metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL pri čemu se dobije intenzivno obojena ljubičasta otopina

U kivetu se doda 1 mL pripremljenog DPPH reagensa i 25 µL uzorka te se nakon sat vremena izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije DPPH radikala koji se računa prema formuli (Yen i Duh, 1994):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(A_{(0)} - A_{(t)}) / A_{(0)}] \times 100 \quad /4/$$

gdje je: $A_{(0)}$ – početna apsorbancija otopine DPPH radikala (t = 0 minuta)

$A_{(t)}$ – apsorbancija reakcijske smjese nakon t = 60 minuta

3.2.4.1.2. FRAP metoda

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} u kiseloj otopini TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin). Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancije pri čemu se žuto obojeni kompleks feri-tripiridiltriazin, uslijed prisustva antioksidansa, reducira u plavo obojeni fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 593 nm (Benzie i Strain, 1999).

Reagensi:

- 0,3 M acetatni pufer (pH = 3,6): odvaže se 3,1 g natrijevog acetata (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija) i otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija) u tikvicu volumena 1 L te nadopuni s destiliranom vodom do oznake;
- 40 mM otopina klorovodične kiseline: 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska) ulije se u tikvicu volumena 1 L te nadopuni s destiliranom vodom do oznake;
- 10 mM otopina TPTZ-a: 79,7 mg TPTZ-a (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka) se otopi u 25 mL 40 mM klorovodične kiseline

- 20 mM otopina željezovog (III) klorida: 275,8 mg željezo (III) klorida (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka) otopi se u 50 mL destilirane vode
- FRAP reagens se priprema miješanjem: 25 mL acetatnog pufera. 2,5 mL otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL otopine željezovog (III) klorida.

Svježe pripremljena otopina FRAP reagensa se termostatira na temperaturi od 37 °C. U 3 mL FRAP reagensa doda se 100 µL uzorka te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. Promjena apsorbancije, izračunata kao razlika između apsorbancije reakcijske smjese nakon 4 minute i spsorbancije očitane prije dodatka uzorka, uspoređuje se s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda (Benzie i Strain, 1999). Rezultati su izraženi kao mmol Fe^{2+} na 100 g borovnice.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripravljene su otopine standarda, željezov (II) klorid u koncentracijama od 19,5 do 1250 mg/L, koje su ispitane prema opisanom postupku. Iz dobivenih podataka nacrta se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije standarda na apscisi i vrijednosti apsorbancije na ordinati.

Jednadžba pravca: $y = 0{,}0022x + 0{,}0028$; $R^2 = 0{,}999$. /5/

gdje je: y = apsorbancija uzorka pri 593 nm

x = ekvivalent Fe^{2+} (mmol/L)

3.2.4.1.3. Rancimat metoda

Antioksidacijski potencijal ekstrakata borovnice u prevenciji oksidacije maslinovog ulja određen je Rancimat metodom (ISO 6886:1996). Ova metoda temelji se na ubrzanom kvarenju ulja pri povišenim temperaturama uz konstantan dovod zraka u uzorak ulja, a oksidacijska stabilnost uzorka prati se indukcijskim periodom. Indukcijski period određuje se na temelju količine izdvojenih kratko lančanih hlapljivih organskih kiselina, uvedenih u demineraliziranu vodu te mjerenjem porasta vodljivosti vode čime se indirektno se prati tijek oksidacijskog kvarenja ulja. Dobivena vrijednost indukcijskog perioda (vrijeme u satima)

ukazuje na otpornost ispitivanog ulja prema oksidaciji. Indukcijski period predstavlja broj sati potreban da analizirano ulje dostigne vrijednost peroksidnog broja od 5 mmoL O_2 /kg.

Oksidacijska stabilnost maslinovog ulja praćena je uz dodatak čistih ekstrakata borovnice i inkapsuliranih u mikroemulzijske sustave i liposome. Za praćenje napretka ubrzane oksidacije maslinovog ulja i određivanje indukcijskog perioda korišten je automatski uređaj Rancimat 743 (Metrohm, Herisau, Švicarska). Uzorci su testirani pri temperaturi od 120 °C s konstantim protokom zraka od 20 L/h. Uzorci maslinovog ulja (3 g) obogaćeni su s 0,2 g čistih ekstrakata i s 0,4 g mikroemulzija i liposoma koji su sadržavali inkapsulirane ekstrakte borovnice. Rezultati su prikazani kao produljenje vremena indukcije u satima.

3.2.4.2. Određivanje antiproliferacijske aktivnosti

Test određivanja antiproliferacijske aktivnosti uzoraka borovnice na odabranim stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) proveden je koristeći MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) reagens.

Stanične linije su nabavljene iz kolekcije ATCC (LGC Standards). Korištene stanične linije su uzgojene u modificiranoj atmosferi pri temperaturi od 37 °C uz 5% CO_2 u DMEM mediju (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (DMEM Euroclone, Milano, Italija) koji je sadržavao 4,5 g/L glukoze, 10% goveđeg fetalnog seruma (FBS) i 1% antibiotika (Penicillin Streptomycin, EuroClone, Milano, Italija). Nakon inkubacije, stanice su presađene na pločice s 96 jažica pri gustoći od 50.000 stanica po jažici. U jažice je dodan DMEM medij i stanice su ostavljene da se priljube uz stijenku podloge preko noći. Prije dodavanja uzoraka, medij je ispran, a stanice su ostale adherirane za dno jažica. Stanice su tretirane u nativnim te probavljenim uzorcima borovnice koji su razrijeđeni s medijem u omjeru 1:10 (120 µL uzorka + 1080 µL medija). U tri jažice, nije dodan nijedan uzorak već su ostavljene stanice u samom DMEM mediju što predstavlja kontrolni uzorak. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka određivala se nakon perioda od 4, 24, 48 i 72 sata. Nakon inkubacije s uzorcima, u svaku jažicu je dodan MTT reagens. Dodatkom MTT reagensa određuje se postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja određenom inhibitoru, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice nemaju sposobnost vezanja MTT reagensa. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Na kraju je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija ljubičastog spoja, biljega živih stanica, za svaku jažicu posebno, uključujući i jažice s kontrolnom skupinom u kojima se očekuje najviši stupanj obojenja, kao i najveća apsorbancija. Da bi se mogla očitati apsorbancija (pri valnoj duljini od 570 nm)

novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO. Apsorbancije iz jažica ispitivanih uzoraka su uspoređene s apsorbancijom iz jažica kontrolne skupine stanica koje nisu izložene djelovanju inhibitora i određen je postotak antiproliferacijskog djelovanja uzoraka borovnice na stanične linije karcinoma dojke.

3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima polifenol oksidaze

Ekstrakcija i određivanje aktivnosti enzima polifenol oksidaze (PPO) provedeno je prema metodi koju su opisali Terefe i sur. (2010). Aktivnost PPO određena je u netretiranoj, pasteriziranoj, liofiliziranoj te jednoj ultrazvučno tretiranoj kaši borovnice pri sljedećim uvjetima: amplituda 100%, vrijeme tretiranja 3 minute (tretman A9 prema parametrima prikazanim u Tablici 4). Uzorak A9 odabran je budući je sadržavao najveći udio ukupnih fenola u odnosu na ostale ultrazvučne tretmane.

Reagensi:

- detergent triton X-100 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka)
- PVPP (polivinilpoli-pirolidon) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka)
- 1 M natrijev-klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 0,2 M natrijev fosfatni pufer (pH = 6,5) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 0,07 M katekol (1,2-dihidroksi-benzen) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka)

Ekstrakcijska otopina pripremila se miješanjem 120 mL natrijevog fosfatnog pufera s 4,80 g PVPP-a, 1,2 mL detergenta triton X-100 i 7,01 g natrijevog klorida. Izvagano je 4,5 mg uzorka te je dodano 4,5 mL ekstrakcijske otopine i homogenizirano pri temperaturi od 4 °C tijekom 3 minute te zatim centrifugirano (NF 1200 R, Nüve, Ankara, Turska) pri 9000 ×g, temperaturi od 4 °C i u trajanju od 30 minuta. Dobiveni supernatant se koristio kao enzimski ekstrakt te je dalje korišten prilikom određivanja aktivnosti PPO.

Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti PPO sadržavala je 300 μL ekstrakta enzima i 1,5 mL 0,07 M katekola pripremljenog u 0,05 M fosfatnom puferu. Apsorbancija je praćena pri valnoj duljini od 420 nm i sobnoj temperaturi tijekom perioda od 10 minuta

koristeći UV-Vis spektrofotometar (BioTek Synergy HTX, Winooski, VT, SAD). Rezultati su izraženi kao postotak preostale aktivnosti enzima prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_{(c)} - A_{(s)}) / A_{(c)}] \times 100 \quad /6/$$

gdje je: $A_{(c)}$ – apsorbancija netretiranog (svježeg) uzorka

$A_{(s)}$ – apsorbancija obrađenog uzorka (pasterizirani, liofilizirani ili ultrazvučno tretirani)

3.2.6. *In vitro* dvofazni model probave

3.2.6.1. Prikupljanje probavnih sokova donora

Humani želučani i crijevni probavni sokovi prikupljeni su od zdravih donora uz prethodno odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (9.5.2017., klasa: 500-03/17-01/42; Ur.br.: 2181-147-01/06/M.S.-17-2) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (21.9.2017., klasa: 614-01/17-02/01; Ur.br.: 380-59-10106-17-100/245).

Uzorci su dobiveni od 8 donora (4 muškog spola i 4 ženskog spola, u dobi od 16-18 godina) koji su prethodno bili podvrgnuti endoskopskoj analizi ždrijela, želuca i tankog crijeva u cilju utvrđivanja zdravstvenog statusa. Za potrebe ovog istraživanja u obzir su uzeti samo zdravi donori bez prethodnih bolesti probavnog sustava ili operativnih zahvata na njemu, donori koje nemaju problem prekomjernog lučenja kiseline u želucu, donori koji ne uzimaju lijekove (inhibitore protonske pumpe ili antibiotike). Endoskopski zahvat proveden je poslije 8 satnog perioda bez uzimanja hrane i pića koristeći video-endoskop uređaj. Želučani i crijevni sokovi usisani su endoskopom nakon postavljanja u želudac ili početni dio tankog crijeva (dvanaesnik). Kod svakog dobrovoljca, 3 mL prvotnog dijela soka je odbačeno i ostatak uzorka je sakupljen u sterilne posude te centrifugiran u cilju odvajanja mukoznih i mrtvih stanica. U cilju smanjenja među-individualnih odstupanja, uzorci su objedinjeni (posebno želučani, posebno crijevni) u jedan reprezentativni uprosječeni uzorak (tzv. *pool*) i spremljeni na temperaturu od –20 °C do daljnjih analiza.

3.2.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti probavnih sokova

Enzimska aktivnost humanih probavnih sokova određena je prema metodi koju su opisali Almaas i sur. (2006) u cilju određivanja optimalne koncentracije probavnih sokova koje

će biti korištene za *in vitro* model probave. Inkubacijska otopina za određivanje proteolitičke aktivnosti želučanih probavnih sokova sadržavala je 1 mL 2,5%-tne otopine goveđeg hemoglobina i 1 mL 0,2 M natrijevog fosfatnog pufera (pH = 7,6) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) te je zakiseljena do pH 3 korištenjem sumporne kiseline. Na isti način pripremljena je i inkubacijska otopina za određivanje proteolitičke aktivnosti crijevnih probavnih sokova ali je kao supstrat sadržavala 1%-tne otopine kazeina te nije prethodno zakiseljena. U 500 µL pripremljene otopine dodano je po 5, 20 i 50 µL humanih želučanih i crijevnih probavnih sokova te inkubirano pri temperaturi od 37 °C. Reakcija je nakon 20 minuta inkubacije zaustavljena dodatkom 1 mL 10%-tne trikloroctene kiseline. Uzorci su zatim centrifugirani te je određena absorbancija produkata hidrolize topljivih u trikloroctenoj kiselini kao mjera proteolize pri valnoj duljini od 280 nm. Jedinica enzimske aktivnosti (U) definirana je kao količina enzima koja daje apsorbanciju = 1 pri 280 nm, nakon perioda od 20 min inkubacije na temperaturi od 37 °C.

3.2.6.3. Postupak in vitro probave

Postupak *in vitro* probave u dvije faze proveden je prema metodama koje su opisali Eriksen i sur. (2010) te Furlund i sur. (2013). Volumen probavnih sokova koji odgovara jedinici enzimske aktivnosti (1 U) bio je 20 µL za želučani sok i 25 µL za crijevni probavni sok.

Za postupak *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu korišteni su pripremljeni nativni uzorci netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane kaše borovnice. Za prvu fazu probave u želucu pH uzoraka je podešen na 2 primjenom 1 M klorovodične kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska), a za drugu fazu probave u tankom crijevu pH je podešen na 7,5 primjenom 2 M natrij hidroksida (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Enzimska aktivnost dodanih želučanih probavnih sokova iznosila je 5 U po gramu uzorka (200 µL; za liofilizirani uzorak 20 µL), a enzimska aktivnost dodanih crijevnih probavnih sokova iznosila je 16 U po gramu uzorka (800 µL; za liofilizirani uzorak 80 µL). Uzorci su inkubirani pri temperaturi od 37 °C u vibracijskom mikseru (Thermo Scientific Thermal Mixer, Fischer Scientific, Hampton, NH, SAD) pri 180 okretaja/minuti tijekom 1 sata za prvu fazu probave u želucu, te tijekom 2 sata za drugu fazu probave u tankom crijevu. Nakon inkubacije epruvete su prenesene izravno na led kako bi se zaustavila enzimska aktivnost. Uzorci su zatim centrifugirani na 1500 okretaja tijekom 5 minuta (NF 1200 R, Nüve, Ankara, Turska), supernatanti izdvojeni te filtrirani preko membranskog filtera, veličine pora 0,45 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) i pohranjeni na temperaturi od –20 °C do daljnje analize.

3.2.7. Inkapsulacija ekstrakata borovnice

Ekstrakti borovnice inkapsulirani su u dvije vrste mikroemulzija i liposome. Nakon njihove inkapsulacije antioksidacijska aktivnost ispitana je Rancimat metodom.

3.2.7.1. Priprema mikroemulzija

Dvije vrste mikroemulzija (ME-1 i ME-2) pripremljene su koristeći ekstra djevičansko maslinovo ulje kao uljnu fazu, surfaktant (Tween 80) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, SAD), kosurfaktant (etanol) i vodu u različitim omjerima. Najbolji omjer sastojaka mikroemulzija određen je preliminarnim istraživanjima i iznosio je za ME-1: 70% smjesa surfaktanta i kosurfaktanta, 20% ekstra djevičanskog maslinovog ulja i 10% vode; a za ME-2: 70% smjesa surfaktanta i kosurfaktanta, 10% ekstra djevičanskog maslinovog ulja i 20% vode. Omjer surfaktanta i kosurfaktanta (Tween 80:etanol) u obje mikroemulzije iznosio je 9:1. Mikroemulzije su pripremljene na dva načina: homogenizacijom sastojaka primjenom mehaničkog homogenizatora Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Njemačka) tijekom perioda od 5 minuta te primjenom ultrazvučnog homogenizatora UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Njemačka) pri frekvenciji od 20 kHz, amplitude 70%, tijekom perioda od 5 minuta. U pripremljene mikroemulzije dodano je 30% ekstrakta borovnice uz miješanje na 700 okretaja/minuti tijekom 1 minute (Thermo Scientific Stirrer, Fischer Scientific, Hampton, NH, SAD).

3.2.7.2. Priprema liposoma

Liposomi su pripremljeni primjenom metode koju su opisali Pravilović i sur. (2015). Metoda se temelji na početnom formiranju mješavine proliposoma koja se sastoji od lipida, etanola i vode te se pretvara u liposome jednostavnim korakom razrjeđivanja (Perrett i sur., 1991). Sojin lecitin Phospholipon 90 G (Phospholipid GmbH, Köln, Njemačka) primijenjen je za pripremu liposoma kao membranski lipid. Sastoji od min. 94% fosfatidilkolina, nezasićenog fosfolipida, koji omogućava liposomima visoku bioraspoloživost (Cevc i sur., 2004). Mješavina proliposoma, koja se sastojala se od Phospholipona 90 G, etanola i vode u omjeru (1:0,8:2), zagrijana je na temperaturi od 60 °C u laboratorijskoj čaši uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 700 okretaja/minuti (Thermo Scientific Stirrer, Fischer Scientific, Hampton, NH, SAD). Otopina je miješana na temperaturi od 60 °C dok nije dobivena homogena otopina.

Nakon hlađenja na temperaturi od 25 °C dodani su ekstrakti borovnice (omjer ekstrakta i Phospholipona 90 G iznosio je 1:10) uz miješanje na 700 okretaja/minuti tijekom perioda od 30 minuta.

3.2.7.3. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma

Veličina i disperznost micela (indeks polidisperznosti) te zeta potencijal mikroemulzija i liposoma određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom koristeći analizator veličine čestica Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK). Fotonska korelacijska spektroskopija omogućuje određivanje veličine dispergiranih čestica u području 2 nm do 3 μm. Svaki uzorak mjeren je tri puta pri sobnoj temperaturi i kao rezultat je uzeta srednja vrijednost.

Fizikalna stabilnost pripremljenih liposoma, čuvanih na temperaturi od 4 °C, praćena je ponovljenim mjerenjima fotonskom korelacijskom spektroskopijom nakon perioda od 7, 14 i 21 dan. Fizikalna stabilnost pripremljenih mikroemulzija ispitana je s obzirom na toplinsku stabilnost i učinke centrifugiranja. Mikroemulzije su čuvane na različitim temperaturama (4° C, 25 °C i 35 °C) radi praćenja mogućeg razdvajanja faza, sedimentacije i flokulacije. Osim toga, mikroemulzije su centrifugirane (Sorvall RC 5B Superspeed Centrifuge, Dupont, Newton, SAD) pri 800 okretaja/minuti tijekom perioda od 20 minuta pri temperaturi od 25 °C i pregledane radi moguće promjene homogenosti.

Viskoznost mikroemulzija mjerena je pri temperaturi od 25 °C koristeći Brookfield viskozimetar (LVDV-E, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, SAD) s vretenom broj 61 i brzinom smicanja od 30 okretaja/min. Električna vodljivost i površinska napetost pripremljenih mikroemulzija također su izmjerene na temperaturi od 25 °C s mjeračem vodljivosti (inoLab 7310, WTW GmbH, Weilheim, Njemačka) i tenziometrom (SIGMA 703D, Biolin Scientific Oy, Espoo, Finska) metodom prstena. Električna vodljivost liposoma mjerena je koristeći Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK).

3.2. Statistička obrada podataka

Podaci su prije statističke obrade provjereni na normalnost distribucije te na homogenost varijanci. Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro-Wilks testom, a homogenost varijanci Levene testom. Podaci koji nisu pokazali normalnu distribuciju niti homogenost varijanci uspoređeni su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom, a za podatke kod

kojih je zabilježena normalna distribucija i homogenost varijanci korišten je t-test i analiza varijance (ANOVA). Za procjenu povezanosti pojedinih obilježja primjenjena je korelacijska analiza (Spermanov koeficijent korelacije). S ciljem određivanja karakterističnih fenolnih spojeva za pojedini ispitivani uzorak s obzirom na korištene metode obrade, primjenjena je analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA).

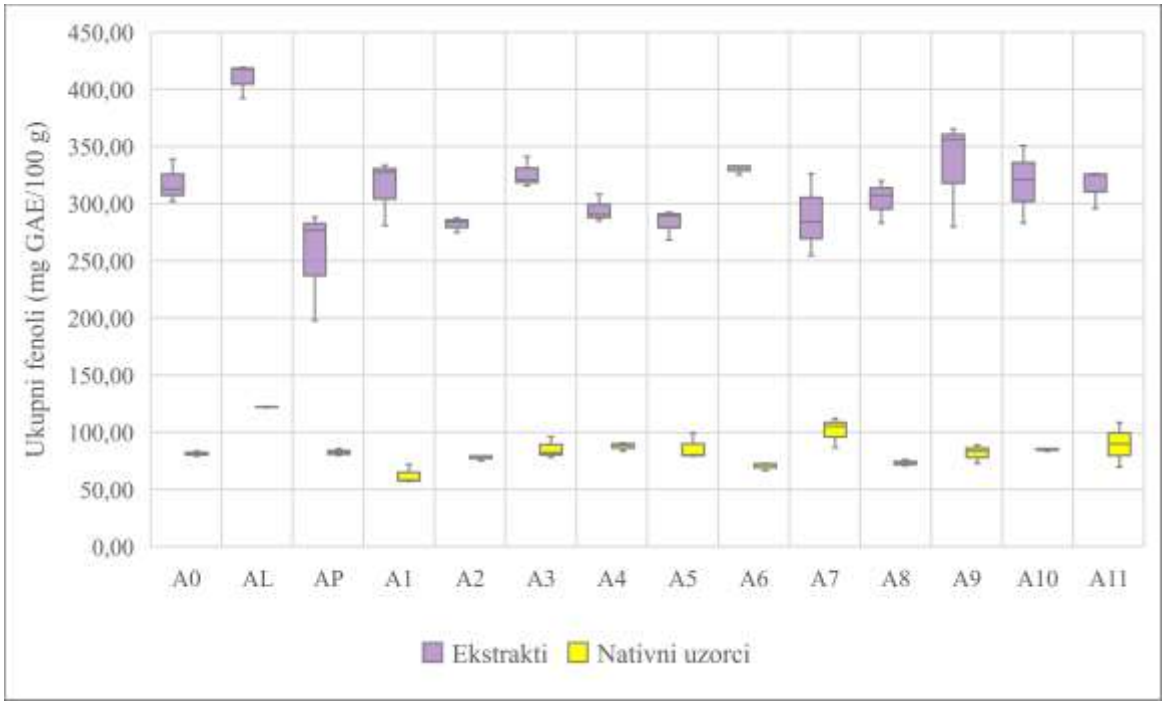
Statistička obrada podataka provela se statističkim programima MedCalc Statistical Software (MedCalc Software, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2014) i Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD; http://www.tibco.com/products/tibco-statistica), a za izradu grafičkih prikaza rezultata korišten je Microsoft Office 2016. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj metoda obrade na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost fenola borovnice

4.1.1 Fenolni profil nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice

Nakon tretmana borovnice različitim metodama obrade fenolni profil ekstrakata i nativnih uzorka određen je spektrofotometrijskom i koromatografskom metodom. Spektrofotometrijskom metodom određen je sadržaj ukupnih fenola, a rezultati su prikazani na Slici 11. Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV/Vis PDA detektor, a rezultati su prikazani u Tablicama 10. do 14.



Slika 11. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima i nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice

Rezultati su prikazani Box and Whisker grafom kao medijani tri određivanja s minimalnim i maksimalnim vrijednostima, a izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) na 100 g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 9. Testiranje značajnosti razlika između ukupnih fenola ekstrakata i nativnih uzoraka

	Ekstrakti	Nativni uzorci
A0	c	b, d, i, j
AL	c, d, e, g, h, j, k, m	a, c, d, e, f, h, i, k, l, m, n
AP	a, b, d, f, i, l, m, n	b, d, i, k
A1	b, c	a, b, c, f, g, h, j, l, m, n
A2	b, f, i, l	b, g, j
A3	c, e, h	b, d, i, k
A4	b	d, e, i, k
A5	b, f, i	b, d, i, k
A6	c, e, h, j	a, b, c, f, g, h, j, l, m, n
A7	b, i	a, d, e, i, k, l
A8	b	b, c, f, g, h, j, m, n
A9	c, e	b, d, i, k
A10	b, c	b, d, i, k
A11	c	b, d, i, k
p-vrijednost	*0,041*	*0,005*

Statistička obrada podataka sa Slike 11. Oznake slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka (a *vs.* A0; b *vs.* AL; c *vs.* AP; d *vs.* A1; e *vs.* A2; f *vs.* A3; g *vs.* A4; h *vs.* A5; i *vs.* A6; j *vs.* A7; k *vs.* A8; l *vs.* A9; m *vs.* A10; n *vs.* A11). Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 10. Koncentracija antocijana u nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određen HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Del-3-Gal[a]	Del-3-Glu[a]	Cy-3-Gal[a]	Del-3-Ara[a]	Pet-3-Gal[a]	Pet-3-Glu[a]	Peo-3-Gal[a]	Peo-3-Glu[a]	Mal-3-Gal[a]	Mal-3-Glu[a]	Mal-3-Ara[a]	∑ [b]
AO	0,28±0,01	-	0,34±0,01	0,14±0,01	0,48±0,02	0,12±0,00	0,32±0,01	-	8,20±0,09	0,31±0,01	3,22±0,01	**13,40±0,02**
AL	1,15±0,03	-	0,31±0,01	0,37±0,02	0,85±0,01	0,16±0,01	0,16±0,00	-	6,11±0,04	0,20±0,00	2,64±0,01	**11,97±0,01**
AP	-	-	-	-	-	-	0,11±0,01	0,19±0,01	2,75±0,03	0,84±0,06	-	**3,89±0,02**
A1	0,18±0,02	0,05±0,01	0,10±0,00	0,11±0,01	0,15±0,00	0,14±0,00	0,04±0,03	-	2,52±0,02	1,31±0,00	1,24±0,01	**5,83±0,01**
A2	0,18±0,01	0,05±0,00	0,09±0,00	0,10±0,01	0,17±0,01	0,12±0,02	0,05±0,00	-	2,02±0,02	1,04±0,06	1,13±0,00	**4,95±0,01**
A3	0,23±0,00	0,06±0,01	0,10±0,01	0,10±0,00	0,21±0,01	0,16±0,00	0,05±0,01	-	2,64±0,01	1,31±0,05	1,35±0,00	**6,21±0,01**
A4	0,52±0,01	0,15±0,04	0,18±0,03	0,29±0,02	0,43±0,00	0,30±0,00	0,11±0,01	-	4,24±0,04	2,05±0,00	2,19±0,01	**10,45±0,02**
A5	0,41±0,01	0,10±0,00	0,18±0,00	0,16±0,01	0,34±0,04	0,29±0,01	0,11±0,00	0,18±0,01	3,96±0,00	2,19±0,01	2,11±0,02	**10,01±0,01**
A6	0,42±0,02	0,10±0,01	0,20±0,01	0,15±0,00	0,35±0,03	0,28±0,01	0,14±0,01	-	4,35±0,02	2,24±0,02	2,14±0,01	**10,35±0,02**
A7	0,35±0,03	0,10±0,00	0,15±0,00	0,15±0,00	0,32±0,01	0,26±0,02	0,09±0,01	0,12±0,02	3,14±0,00	1,82±0,03	1,77±0,00	**8,27±0,01**
A8	0,71±0,01	0,08±0,01	0,18±0,02	0,19±0,01	0,30±0,00	0,21±0,01	0,09±0,01	-	3,62±0,03	1,86±0,02	1,80±0,03	**9,04±0,02**
A9	0,26±0,03	0,04±0,00	0,11±0,01	0,11±0,00	0,21±0,01	0,15±0,00	0,07±0,00	0,08±0,01	2,46±0,02	1,31±0,00	1,26±0,00	**6,06±0,01**
A10	0,26±0,00	0,04±0,00	0,11±0,00	0,10±0,00	0,22±0,00	0,16±0,00	0,06±0,00	-	2,82±0,08	1,36±0,00	1,36±0,05	**6,50±0,02**
A11	0,66±0,00	0,13±0,00	0,28±0,02	0,40±0,01	0,52±0,02	0,30±0,05	0,12±0,02	-	4,78±0,01	2,31±0,02	2,54±0,02	**12,00±0,02**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD.

Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

[a] Del-3-Gal = delfinidin-3-galaktozid; Del-3-Glu = delfinidin-3-glukozid; Cy-3-Gal = cijanidin-3-galaktozid; Del-3-Ara = delfinidin-3-arabinozid; Pet-3-Gal = petunidin-3-galaktozid; Pet-3-Glu = petunidin-3-glukozid; Peo-3-Gal = peonidin-3-galaktozid; Peo-3-Glu = peonidin-3-gluktozid; Mal-3-Gal = malvidin-3-galaktozid; Mal-3-Glu = malvidin-3-glukozid; Mal-3-Ara = malvidin-3-arabinozid.

[b] ∑ = ukupni antocijani kao zbroj pojedinačno identificiranih antocijana

Tablica 11. Koncentracija antocijana u ekstraktima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određen HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

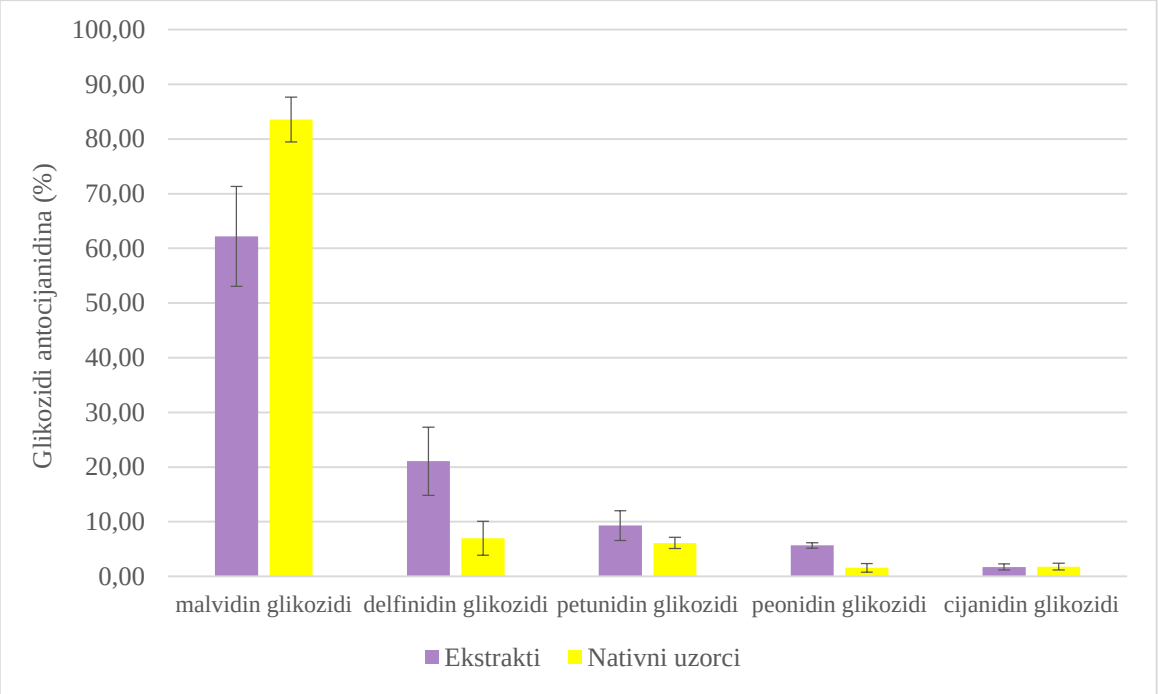
	Del-3-Gal[a]	Del-3-Glu[a]	Cy-3-Gal[a]	Del-3-Ara[a]	Pet-3-Gal[a]	Pet-3-Glu[a]	Peo-3-Gal[a]	Peo-3-Glu[a]	Mal-3-Gal[a]	Mal-3-Glu[a]	Mal-3-Ara[a]	∑ [b]
AO	14,71±0,03	-	2,03±0,03	9,11±0,01	9,10±0,00	0,89±0,01	0,78±0,02	3,91±0,02	31,54±0,13	0,84±0,03	16,63±0,09	**89,53±0,04**
AL	11,29±0,01	-	1,89±0,01	6,35±0,04	7,32±0,04	0,86±0,02	0,45±0,04	3,57±0,00	25,46±0,06	1,11±0,03	16,52±0,01	**74,80±0,03**
AP	-	-	-	-	-	-	1,40±0,00	-	14,82±0,01	4,47±0,00	-	**20,69±0,04**
A1	6,55±0,02	2,01±0,01	1,06±0,02	5,36±0,00	3,84±0,05	2,30±0,01	0,59±0,01	3,49±0,04	17,69±0,04	8,45±0,01	12,33±0,04	**63,63±0,02**
A2	5,91±0,01	1,42±0,02	1,01±0,01	4,91±0,01	3,69±0,02	2,10±0,08	0,66±0,01	2,99±0,02	17,62±0,05	8,26±0,04	12,00±0,01	**60,54±0,03**
A3	7,19±0,01	2,02±0,00	1,16±0,00	6,14±0,09	4,23±0,01	2,59±0,02	0,56±0,00	3,30±0,01	18,96±0,02	9,13±0,01	13,05±0,05	**68,30±0,02**
A4	7,02±0,00	1,74±0,05	1,03±0,01	5,31±0,01	3,98±0,03	2,22±0,03	0,62±0,02	2,88±0,04	17,59±0,03	7,85±0,04	11,54±0,02	**61,76±0,02**
A5	5,32±0,01	1,46±0,04	0,97±0,06	4,66±0,05	3,41±0,01	2,08±0,01	0,51±0,03	2,60±0,08	16,35±0,07	7,35±0,02	10,94±0,04	**55,62±0,04**
A6	7,10±0,00	1,73±0,04	1,20±0,00	5,60±0,06	3,99±0,01	2,23±0,01	0,50±0,01	2,80±0,00	17,75±0,06	7,94±0,08	11,73±0,04	**62,56±0,03**
A7	6,56±0,01	1,78±0,01	1,14±0,03	5,18±0,11	3,64±0,07	2,18±0,01	0,40±0,00	2,78±0,01	16,59±0,11	7,78±0,01	11,28±0,03	**59,30±0,04**
A8	7,24±0,00	1,85±0,00	1,26±0,01	5,82±0,06	4,07±0,04	2,35±0,02	0,61±0,02	3,29±0,01	18,20±0,01	7,82±0,03	11,96±0,00	**64,45±0,02**
A9	6,74±0,05	1,60±0,03	1,08±0,01	5,05±0,05	3,74±0,00	2,05±0,06	0,51±0,01	2,89±0,02	17,18±0,03	7,45±0,00	11,25±0,03	**59,52±0,03**
A10	6,27±0,00	1,43±0,00	1,08±0,03	5,08±0,01	3,51±0,01	2,00±0,00	0,53±0,01	2,35±0,00	16,90±0,03	7,11±0,01	10,73±0,00	**56,99±0,01**
A11	6,45±0,06	1,31±0,15	0,93±0,06	4,89±0,01	3,52±0,03	1,91±0,00	0,40±0,02	2,52±0,02	15,95±0,00	7,12±0,07	10,34±0,04	**55,32±0,03**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD.

Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

[a] Del-3-Gal = delfinidin-3-galaktozid; Del-3-Glu = delfinidin-3-glukozid; Cy-3-Gal = cijanidin-3-galaktozid; Del-3-Ara = delfinidin-3-arabinozid; Pet-3-Gal = petunidin-3-galaktozid; Pet-3-Glu = petunidin-3-glukozid; Peo-3-Gal = peonidin-3-galaktozid; Peo-3-Glu = peonidin-3-gluktozid; Mal-3-Gal = malvidin-3-galaktozid; Mal-3-Glu = malvidin-3-glukozid; Mal-3-Ara = malvidin-3-arabinozid.

[b] ∑ = ukupni antocijani kao zbroj pojedinačno identificiranih antocijana



Slika 12. Udio glikozida antocijanidina u ekstraktima i nativnim uzorcima

Tablica 12. Koncentracija flavonol glikozida u nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određen HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Q (der. 1) [a]	Q (der. 2) [a]	Q (der. 3) [a]	Q-3-glu [a]	Q (der. 4) [a]	Q (der. 5) [a]	Q (der. 6) [a]	∑ [b]
AO	2,74 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,27 ± 0,00	1,80 ± 0,02	2,75 ± 0,06	1,33 ± 0,01	1,23 ± 0,03	**10,66 ± 0,02**
AL	5,99 ± 0,03	0,87 ± 0,01	0,28 ± 0,01	1,15 ± 0,02	-	1,36 ± 0,01	-	**9,65 ± 0,01**
AP	-	-	0,61 ± 0,01	3,59 ± 0,01	1,06 ± 0,01	-	-	**5,26 ± 0,01**
A1	1,44 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,22 ± 0,00	-	0,52 ± 0,03	-	**2,47 ± 0,01**
A2	1,43 ± 0,01	0,41 ± 0,00	-	0,20 ± 0,00	-	0,40 ± 0,03	-	**2,44 ± 0,01**
A3	2,22 ± 0,03	-	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,01	-	0,52 ± 0,00	-	**3,13 ± 0,01**
A4	3,31 ± 0,02	-	-	0,61 ± 0,01	-	0,71 ± 0,01	-	**4,63 ± 0,01**
A5	3,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,35 ± 0,02	-	0,78 ± 0,01	-	**4,60 ± 0,01**
A6	4,15 ± 0,04	-	0,19 ± 0,00	0,48 ± 0,00	-	0,87 ± 0,00	-	**5,69 ± 0,01**
A7	3,00 ± 0,01	-	0,15 ± 0,04	0,25 ± 0,04	-	0,55 ± 0,00	-	**3,95 ± 0,02**
A8	3,43 ± 0,01	-	0,14 ± 0,00	0,42 ± 0,00	-	0,75 ± 0,03	-	**4,74 ± 0,01**
A9	2,53 ± 0,00	-	-	0,39 ± 0,01	-	0,53 ± 0,01	-	**3,46 ± 0,01**
A10	2,56 ± 0,01	-	-	0,32 ± 0,01	-	0,55 ± 0,01	-	**3,42 ± 0,01**
A11	3,41 ± 0,03	-	0,14 ± 0,00	0,43 ± 0,01	-	0,71 ± 0,01	-	**4,69 ± 0,01**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD.

Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

[a] Q (der. 1), Q (der. 2), Q (der. 3), Q (der. 4), Q (der. 5) i Q (der. 6) = derivati kvercetina; Q-3-glu = kvercetin-3-glukozid.

[b] ∑ = ukupni flavonol glikozidi kao zbroj pojedinačno identificiranih flavonol glikozida.

Tablica 13. Koncentracija flavonol glikozida i fenolne kiseline u ekstraktima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određen HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Q (der. 1) [a]	Q (der. 3) [a]	Q-3-glu [a]	Q (der. 5) [a]	∑ [b]	ChA [a]
AO	4,54 ± 0,08	2,79 ± 0,02	4,55 ± 0,01	1,72 ± 0,04	**13,58 ± 0,04**	7,74 ± 0,06
AL	10,40 ± 0,04	-	-	2,39 ± 0,01	**12,79 ± 0,02**	9,68 ± 0,02
AP	-	0,17 ± 0,01	2,01 ± 0,01	0,73 ± 0,04	**2,90 ± 0,01**	5,64 ± 0,06
A1	7,31 ± 0,01	-	-	1,77 ± 0,01	**9,07 ± 0,01**	3,04 ± 0,05
A2	5,00 ± 0,04	-	-	1,70 ± 0,01	**6,70 ± 0,03**	2,10 ± 0,01
A3	5,51 ± 0,01	1,34 ± 0,01	-	2,03 ± 0,00	**8,88 ± 0,01**	2,23 ± 0,01
A4	5,03 ± 0,02	-	0,97 ± 0,06	1,67 ± 0,00	**7,67 ± 0,03**	3,04 ± 0,02
A5	5,99 ± 0,012	-	-	1,61 ± 0,01	**7,59 ± 0,01**	7,58 ± 0,00
A6	6,47 ± 0,04	-	0,93 ± 0,04	1,68 ± 0,03	**9,08 ± 0,04**	2,07 ± 0,00
A7	5,99 ± 0,02	-	0,90 ± 0,00	2,75 ± 0,00	**9,64 ± 0,01**	3,36 ± 0,01
A8	7,79 ± 0,02	-	1,00 ± 0,02	2,04 ± 0,01	**10,82 ± 0,02**	2,80 ± 0,01
A9	7,76 ± 0,06	-	0,89 ± 0,01	2,05 ± 0,05	**10,69 ± 0,04**	2,95 ± 0,07
A10	6,98 ± 0,05	-	0,98 ± 0,02	1,95 ± 0,06	**9,90 ± 0,04**	2,32 ± 0,01
A11	5,60 ± 0,01	-	0,83 ± 0,00	2,95 ± 0,07	**10,28 ± 0,03**	2,90 ± 0,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).
[a] Q (der. 1); Q (der. 3) i Q (der. 5) = derivati kvercetina; Q-3-glu = kvercetin-3-glukozid; ChA = klorogenska kiselina.
[b] ∑ = ukupni flavonol glikozidi kao zbroj pojedinačno identificiranih flavonol glikozida.

Tablica 14. Koncentracija fenolnih kiselina u nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određen HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

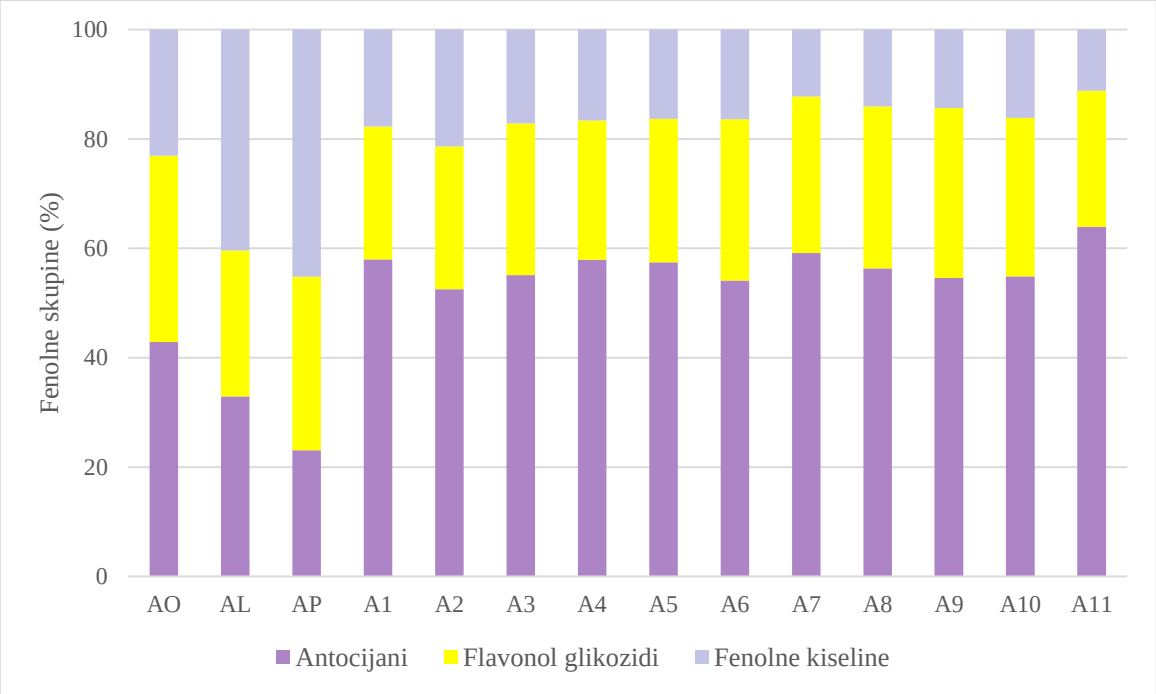
	HBK (der. 1) [a]	HCK (der. 1) [a]	HCK (der. 2) [a]	HCK (der. 3) [a]	ChA [a]	CA [a]	*p*-CA [a]	∑ [b]
AO	0,56 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,96 ± 0,00	-	3,86 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,66 ± 0,02	**7,25 ± 0,02**
AL	0,92 ± 0,00	0,68 ± 0,02	1,08 ± 0,03	-	11,89 ± 0,01	0,05 ± 0,00	-	**14,63 ± 0,01**
AP	-	0,63 ± 0,00	0,61 ± 0,01	0,49 ± 0,01	5,12 ± 0,00	-	0,64 ± 0,00	**7,49 ± 0,01**
A1	0,36 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,78 ± 0,01	-	-	-	0,18 ± 0,02	**1,80 ± 0,02**
A2	0,44 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,88 ± 0,00	-	-	-	0,32 ± 0,01	**2,02 ± 0,00**
A3	0,51 ± 0,00	0,43 ± 0,02	0,99 ± 0,00	-	-	-	-	**1,93 ± 0,01**
A4	0,46 ± 0,01	0,54 ± 0,00	1,07 ± 0,06	-	0,55 ± 0,01	-	0,41 ± 0,03	**3,03 ± 0,02**
A5	0,37 ± 0,01	0,65 ± 0,01	1,21 ± 0,02	-	-	0,12 ± 0,00	0,52 ± 0,01	**2,87 ± 0,01**
A6	0,44 ± 0,01	0,71 ± 0,00	1,23 ± 0,00	-	-	-	0,77 ± 0,01	**3,14 ± 0,00**
A7	0,12 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,81 ± 0,02	-	-	-	0,31 ± 0,01	**1,70 ± 0,01**
A8	-	0,57 ± 0,01	1,25 ± 0,01	-	-	-	0,42 ± 0,03	**2,24 ± 0,02**
A9	0,24 ± 0,00	0,39 ± 0,01	0,95 ± 0,00	-	-	-	-	**1,59 ± 0,00**
A10	0,47 ± 0,01	0,44 ± 0,00	1,00 ± 0,01	-	-	-	-	**1,92 ± 0,01**
A11	0,42 ± 0,02	0,48 ± 0,04	0,94 ± 0,01	-	0,27 ± 0,00	-	-	**2,10 ± 0,02**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD.

Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

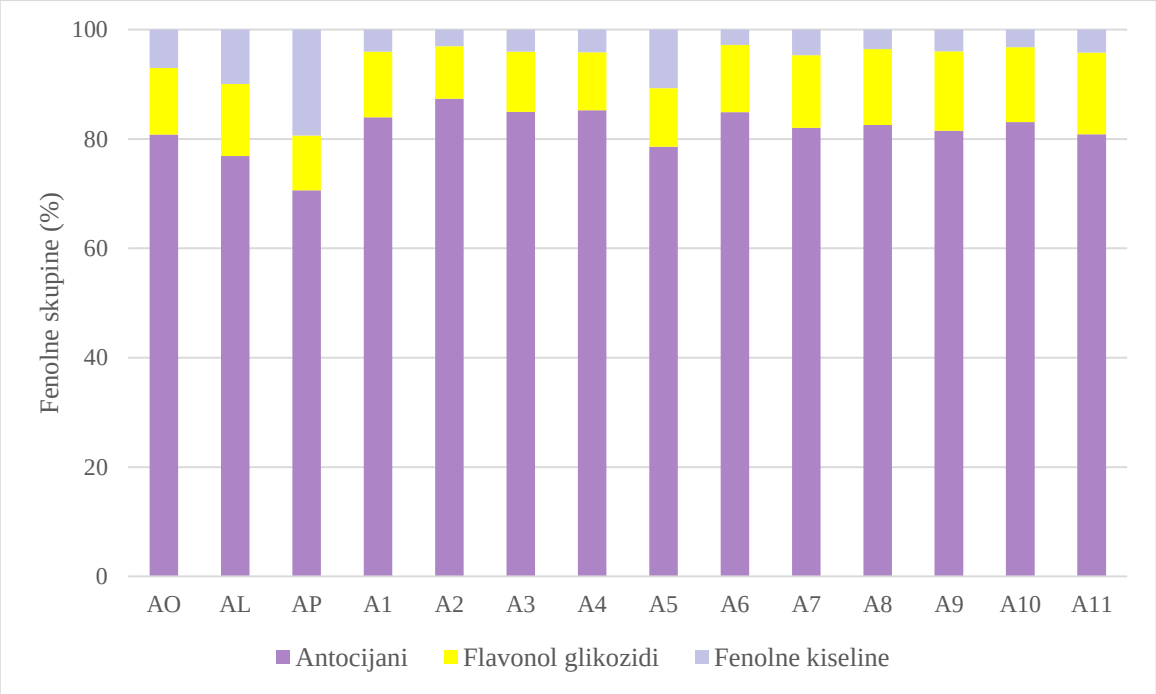
[a] HBK (der. 1) = derivat hidroksibenzojeve kiseline; HCK (der. 1), HCK (der. 2), HCK (der. 3) = derivati hidroksicimetne kiseline; ChA = klorogenska kiselina; CA = kafeinska kiselina; *p*-CA = *p*-kumarinska kiselina.

[b] ∑ = ukupne fenolne kiseline kao zbroj pojedinačno identificiranih fenolnih kiselina



Slika 13. Udio pojedinih fenolnih skupina u nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice

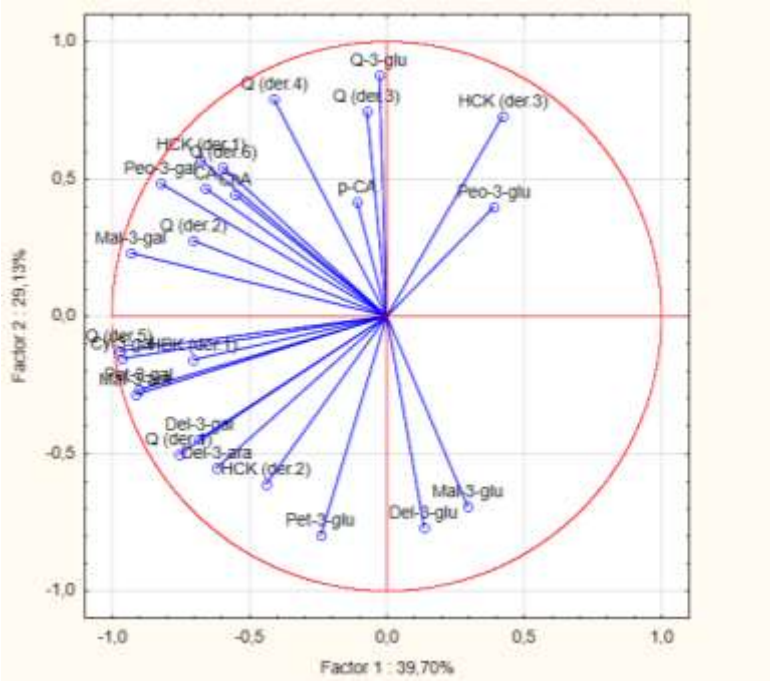
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



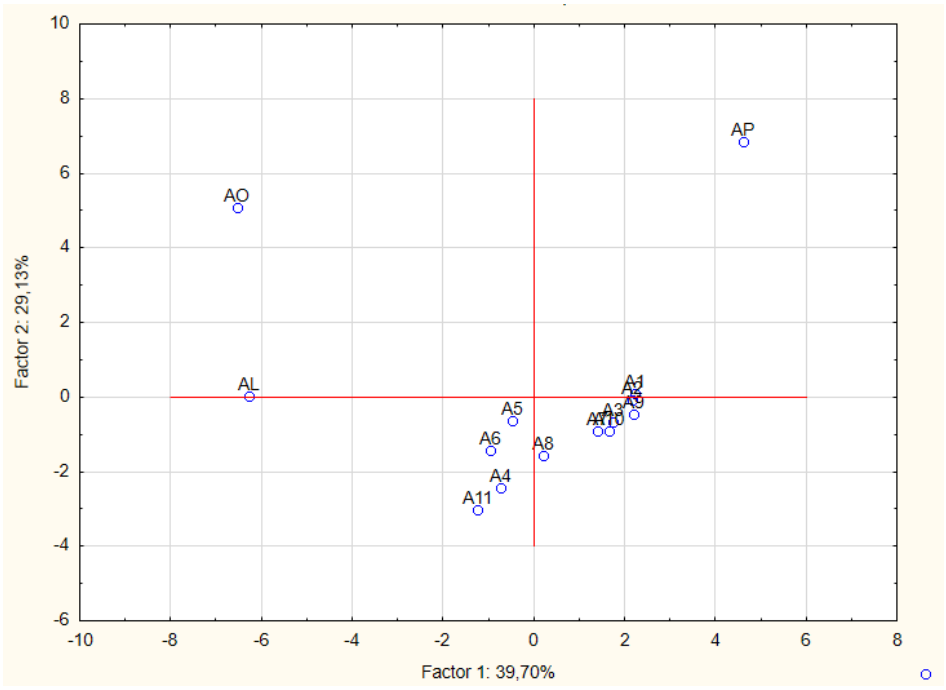
Slika 14. Udio pojedinih fenolnih skupina u ekstraktima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice

Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Rezultati određivanja fenolnih skupina u nativnim uzorcima i ekstraktima analizirani su primjenom metode glavnih komponenata (PCA) s ciljem određivanja karakterističnih fenolnih spojeva za pojedini ispitivani uzorak s obzirom na korištene metode obrade. Rezultati PCA analize za nativne uzorke i ekstrakte prikazani su na Slikama 15. i 16.

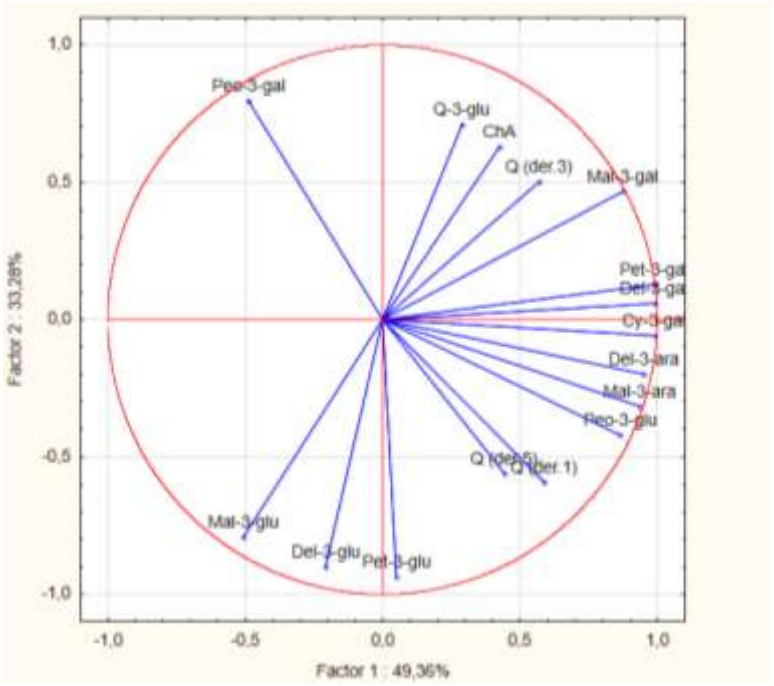


(a)

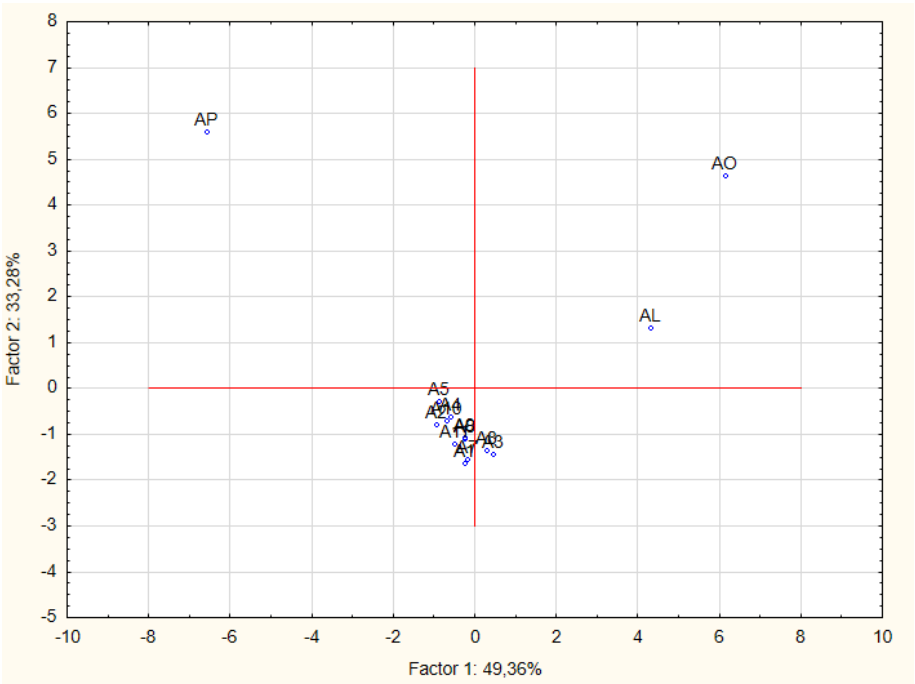


(b)

Slika 15. PC1 *vs.* PC2 za pojedinačne fenolne spojeve (a) u nativnim uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice (b)



(a)



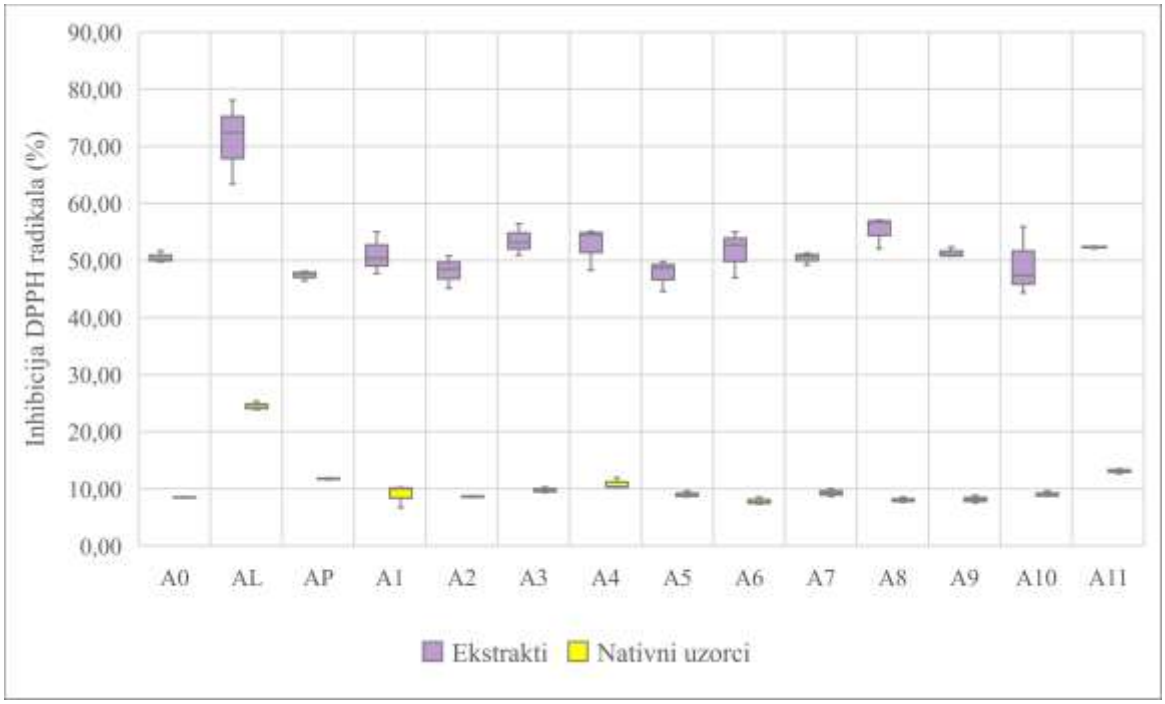
(b)

Slika 16. PC1 *vs.* PC2 za pojedinačne fenolne spojeve (a) u ekstraktima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice (b)

4.1.2 Antioksidacijska aktivnost nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice

Antioksidacijska aktivnost nativnih uzoraka i ekstrakata određena je DPPH i FRAP metodama, a rezultati su prikazani na Slikama 17. i 18. Korelacija između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama u nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice prikazana je u Tablicama 17. i 18.

Učinak ekstrakata borovnice na produženje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja određen je Rancimat matodom, a rezultati su prikazani u Tablici 19.



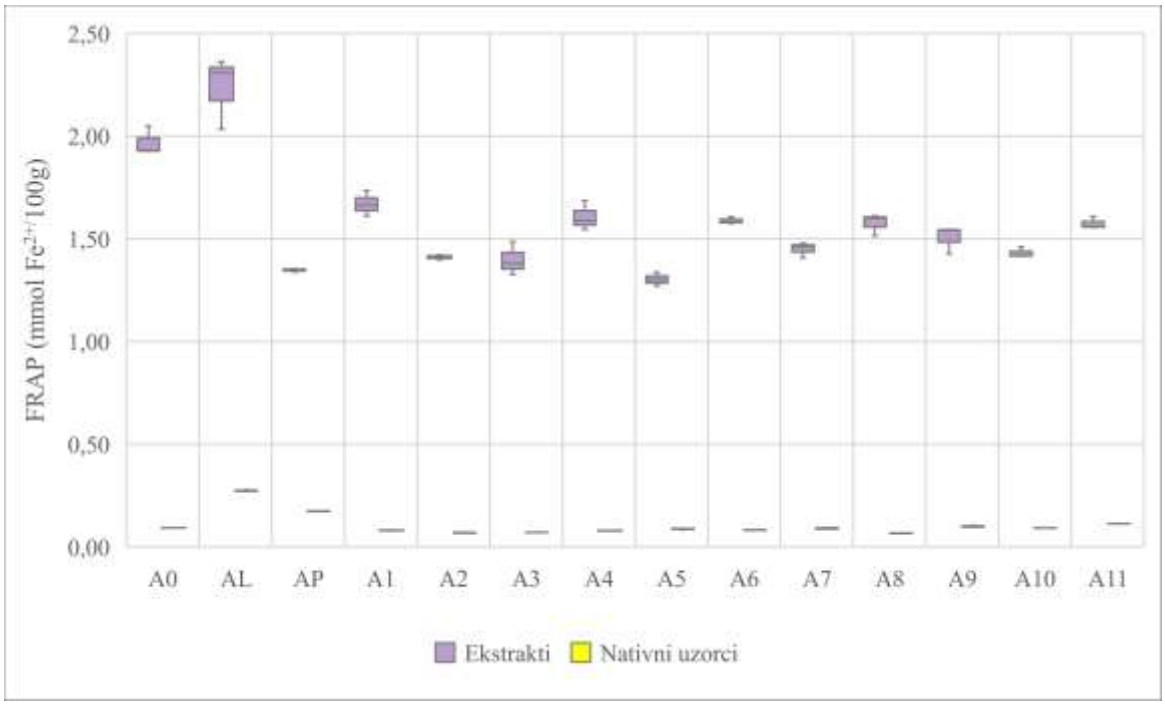
Slika 17. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata i nativnih uzoraka netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice izražena postotkom inhibicije DPPH radikala

Rezultati su prikazani Box and Whisker grafom kao medijani tri određivanja s minimalnim i maksimalnim vrijednostima, a izraženi kao % inhibicije DPPH radikala na 100g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 15. Testiranje značajnosti razlika između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i nativnih uzoraka

	Ekstrakti	Nativni uzorci
A0	b, k	b, c, f, g, j, m, n
AL	a, c, d, e, h, i, j, l, m	a, d, e, f, h, i, j, k, l, m
AP	b, f, g, i, k, n	a, d, e, h, i, j, k, l, m
A1	b	b, c, g, i, k, n
A2	b, f, k, n	b, c, f, g, n
A3	c, e, h	a, b, e, i, k, l, n
A4	c, h	a, d, e, h, i, j, k, l, m
A5	b, f, g, k, n	b, c, g, i, k, n
A6	b, c	b, c, d, f, g, h, j, m, n,
A7	b, k	a, b, c, g, i, k, l, n
A8	a, c, e, h, j, m	b, c, d, f, g, h, j, m, n,
A9	b	b, c, f, g, j, m, n
A10	b, k	a, b, c, g, i, k, l, n
A11	c, e, h	a, d, e, f, h, i, j, k, l, m
p-vrijednost	*0,031*	*0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 17. Oznake slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka (a *vs.* A0; b *vs.* AL; c *vs.* AP; d *vs.* A1; e *vs.* A2; f *vs.* A3; g *vs.* A4; h *vs.* A5; i *vs.* A6; j *vs.* A7; k *vs.* A8; l *vs.* A9; m *vs.* A10; n *vs.* A11). Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 18. Redukcijska aktivnost ekstrakata i nativnih uzoraka netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice određena FRAP metodom

Rezultati su prikazani Box and Whisker grafom kao medijani tri određivanja s minimalnim i maksimalnim vrijednostima, a izraženi u mmol Fe^{2+}/L na 100g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 16. Testiranje značajnosti razlika između redukcijske aktivnosti ekstrakata i nativnih uzoraka netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice

	Ekstrakti	Nativni uzorci
A0	a	b
AL	a	a
AP	b	a, c
A1	a, c	d
A2	b, d	e, h
A3	b, d	e
A4	c, e	d
A5	b	f
A6	c, e	d
A7	d, f	b, f
A8	c, e	h
A9	f	g
A10	d, f	b
A11	e	c, g
p-vrijednost	*<0,001*	*<0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 18. Različita slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku. Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 17. Koeficijenti korelacije između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) u nativnim uzorcima borovnice

	Ukupni fenoli	Antocijani	Fenolne kis.	Flavonoli
FRAP	0,732**	0,191	0,904**	0,567*
DPPH	0,732**	0,278	0,676**	0,374

* statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,05$)
** statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,01$)

Tablica 18. Koeficijenti korelacije između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) u ekstraktima borovnice

	Ukupni fenoli	Antocijani	Fenolne kis.	Flavonoli
FRAP	0,785**	0,626*	0,583*	0,693**
DPPH	0,859**	0,416	0,477	0,540*

* statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,05$)
** statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,01$)

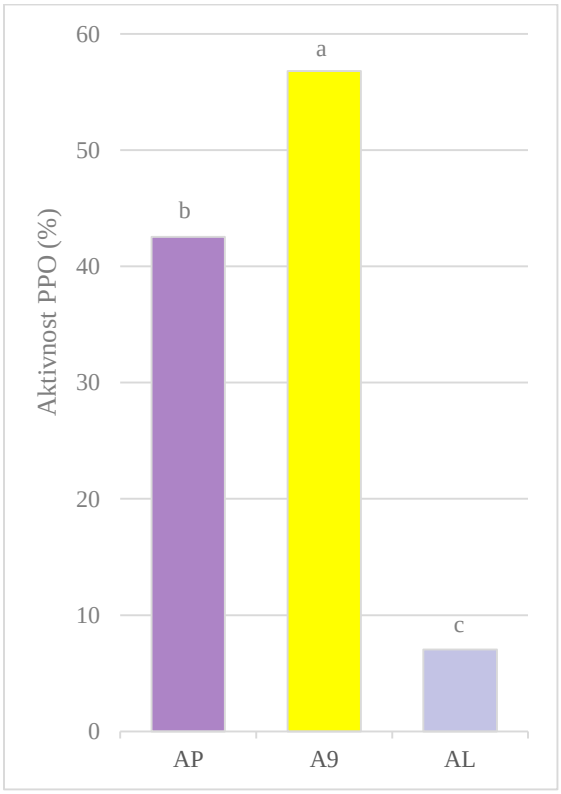
Tablica 19. Produljenje oksidacijske stabilnosti (izraženo kroz vrijeme indukcije u satima) maslinovog ulja s dodanim ekstraktima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice

Uzorak	Vrijeme indukcije (h)
A0	0,00
AL	0,00
AP	0,62 ± 0,13 *
A1	0,46 ± 0,34 *
A2	0,94 ± 0,25 *
A3	0,75 ± 0,17 *
A4	0,95 ± 0,13 *
A5	0,00
A6	0,00
A7	0,02 ± 0,14
A8	0,03 ± 0,17
A9	0,00
A10	0,00
A11	0,00
p-vrijednost	*0,029*

Rezultati predstavljaju srednju vrijednosti tri određivanja ± SD. Vrijednosti označene s * statistički se značajno razlikuju od kontrolnog uzorka (indukcijsko vrijeme čistog maslinovog ulja = 10,43 sati). Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

4.2. Utjecaj metoda obrade na aktivnost enzima polifenol oksidaze iz borovnice

Učinak primijenjenih metoda obrade kultivirane borovnice (pasterizacija, liofilizacija te ultrazvučni tretman pri amplitudi 100% tijekom 3 minute) ispitan je na aktivnost enzima polifenol oksidaze, a rezultati su prikazani na Slici 19.



Slika 19. Aktivnost polifenol oksidaze borovnice nakon pasterizacije, tretmana ultrazvukom i liofilizacije

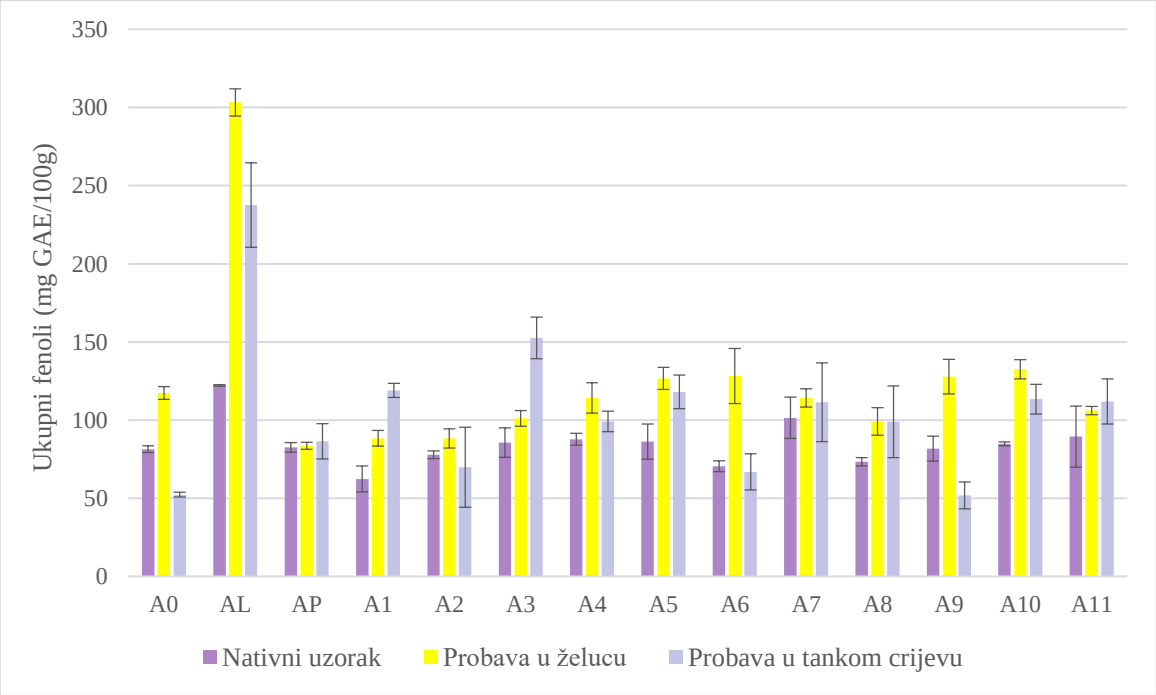
Rezultati predstavljaju medijane triju određivanja. Stupci označeni različitim malim slovima statistički se značajno razlikuju (p=0,027). Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: AP = pasterizirana borovnica; A9 = ultrazvučno tretirana borovnica (amplituda 100%, 3 minute); AL = liofilizirana borovnica.

4.3. Utjecaj metoda obrade na *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost i biološku aktivnost fenolnih spojeva borovnice

4.3.1. Fenolni profil uzoraka prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave

Sadržaj ukupnih fenola prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određen je spektrofotometrijskom metodom, a rezultati su prikazani na Slici 20. Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV/Vis PDA detektor, a rezultati su prikazani u Tablicama 22. do 35.

Utjecaj primjenjenih metoda obrade i *in vitro* probave na sadržaj ukupnih fenola i pojedinih skupina fenolnih spojeva borovnice određen je analizom varijance, a rezultati su prikazani u Tablici 36.



Slika 20. Stabilnost ukupnih fenolnih spojeva netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD), a izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) na 100g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 20. Utjecaj *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu na stabilnost ukupnih fenola

	Nativni *vs.* probava u želucu		Nativni *vs.* probava u tankom crijevu	
	% stabilnosti	p-vrijednost	% stabilnosti	p-vrijednost
A0	+ 44,28	*0,009*	– 35,76	*0,005*
AL	+ 148,36	*0,001*	+ 94,52	*0,019*
AP	+ 1,27	ns	+ 4,74	ns
A1	+ 41,69	ns	+ 91,01	*0,013*
A2	+ 13,48	ns	– 10,36	ns
A3	+ 18,15	ns	+ 78,31	*0,022*
A4	+ 30,32	*0,027*	+ 13,01	ns
A5	+ 46,81	*0,016*	+ 36,85	ns
A6	+ 82,05	*0,034*	– 5,15	ns
A7	+ 12,67	ns	+ 9,86	ns
A8	+ 35,38	*0,039*	+ 34,95	ns
A9	+ 56,46	*0,034*	– 36,64	ns
A10	+ 56,10	*0,004*	+ 33,61	*0,033*
A11	+ 18,66	ns	+ 25,12	ns

Statistička obrada podataka sa Slike 20. Statistički značajna razlika određena t-testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 21. Testiranje značajnosti razlika između ukupnih fenola s obzirom na metodu obrade nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu

	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
A0	c, d	b
AL	a	a
AP	e	c, d
A1	e, f	e, f
A2	e, f	b, c
A3	f, g	a, e
A4	d, h	c, g
A5	b, c	e, h
A6	b, c	b, c
A7	d, i	f, g, h
A8	g	d, f, g, h
A9	b, c	b
A10	a, b	f, g, h
A11	g, h, i	f, g, h
p-vrijednost	*<0,001*	*<0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 20. Različita slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku. Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 22. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku netretirane borovnice (A0) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,28 ± 0,01	4,69 ± 0,05	-
Delfinidin-3-glukozid	-	-	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,34 ± 0,01	1,07 ± 0,00	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,14 ± 0,01	2,54 ± 0,01	-
Petunidin-3-galaktozid	0,48 ± 0,02	3,54 ± 0,02	-
Petunidin-3-glukozid	0,12 ± 0,00	0,51 ± 0,00	-
Peonidin-3-galaktozid	0,32 ± 0,01	0,72 ± 0,04	-
Peonidin-3-glukozid	-	1,66 ± 0,02	-
Malvidin-3-galaktozid	8,20 ± 0,09	19,21 ± 0,12	-
Malvidin-3-glukozid	0,31 ± 0,01	0,74 ± 0,00	-
Malvidin-3-arabinozid	3,22 ± 0,01	9,32 ± 0,06	-
Ukupno (mg)	**13,40 ± 0,02**	**43,98 ± 0,03**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	2,74 ± 0,01	3,54 ± 0,07	-
Kvercetin (der. 2)	0,55 ± 0,01	0,96 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	0,27 ± 0,00	0,35 ± 0,00	-
Kvercetin-3-glukozid	1,80 ± 0,02	1,76 ± 0,04	-
Kvercetin (der. 4)	2,75 ± 0,06	2,39 ± 0,09	-
Kvercetin (der. 5)	1,33 ± 0,01	1,08 ± 0,00	0,16 ± 0,02
Kvercetin (der. 6)	1,23 ± 0,03	1,27 ± 0,05	-
Kvercetin (der. 9)	-	-	0,32 ± 0,00
Kvercetin (der. 10)	-	-	0,36 ± 0,02
Ukupno (mg)	**10,66 ± 0,02**	**11,34 ± 0,04**	**0,83 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,56 ± 0,01	0,66 ± 0,02	1,70 ± 0,01
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	5,07 ± 0,11
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,98 ± 0,02	0,80 ± 0,00	0,33 ± 0,02
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,96 ± 0,00	0,84 ± 0,08	0,62 ± 0,07
Klorogenska kiselina	3,86 ± 0,03	5,43 ± 0,12	-
Kafeinska kiselina	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	-
p-kumarinska kiselina	0,66 ± 0,02	0,62 ± 0,06	-
Ukupno (mg)	**7,25 ± 0,02**	**8,52 ± 0,05**	**7,71 ± 0,05**

Tablica 23. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku liofilizirane borovnice (AL) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	1,15 ± 0,03	17,33 ± 0,17	-
Delfinidin-3-glukozid	-	0,21 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,31 ± 0,01	2,98 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,37 ± 0,02	9,93 ± 0,03	-
Petunidin-3-galaktozid	0,85 ± 0,01	11,93 ± 0,04	-
Petunidin-3-glukozid	0,16 ± 0,01	1,91 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,16 ± 0,00	1,28 ± 0,03	-
Peonidin-3-glukozid	-	6,18 ± 0,02	-
Malvidin-3-galaktozid	6,11 ± 0,04	40,23 ± 0,25	-
Malvidin-3-glukozid	0,20 ± 0,00	1,96 ± 0,03	-
Malvidin-3-arabinozid	2,64 ± 0,01	25,39 ± 0,04	-
Ukupno (mg)	**11,97 ± 0,01**	**119,32 ± 0,06**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	5,99 ± 0,03	15,53 ± 0,04	-
Kvercetin (der. 2)	0,87 ± 0,01	2,37 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	0,28 ± 0,01	0,63 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	1,15 ± 0,02	3,12 ± 0,02	-
Kvercetin (der. 4)	-	0,11 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 5)	1,36 ± 0,01	3,48 ± 0,01	0,90 ± 0,01
Kvercetin (der. 6)	-	0,13 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 7)	-	-	3,85 ± 0,03
Kvercetin (der. 8)	-	-	0,37 ± 0,01
Kvercetin (der. 9)	-	-	0,47 ± 0,01
Ukupno (mg)	**9,65 ± 0,01**	**25,36 ± 0,02**	**5,58 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,92 ± 0,00	0,88 ± 0,01	1,08 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,68 ± 0,02	0,85 ± 0,01	0,42 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,08 ± 0,03	1,50 ± 0,03	0,49 ± 0,00
Klorogenska kiselina	11,89 ± 0,01	18,32 ± 0,04	1,24 ± 0,01
Kafeinska kiselina	0,05 ± 0,00	-	-
p-kumarinska kiselina	-	0,48 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**14,63 ± 0,01**	**22,02 ± 0,02**	**3,22 ± 0,01**

Tablica 24. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku pasterizirane borovnice (AP) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Peonidin-3-galaktozid	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	-
Malvidin-3-galaktozid	2,75 ± 0,03	2,79 ± 0,02	-
Malvidin-3-glukozid	0,84 ± 0,06	0,80 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**3,89 ± 0,02**	**3,95 ± 0,01**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 3)	0,61 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,18 ± 0,00
Kvercetin-3-glukozid	3,59 ± 0,01	2,44 ± 0,03	1,68 ± 0,01
Kvercetin (der. 4)	1,06 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,85 ± 0,01
Ukupno (mg)	**5,26 ± 0,01**	**3,57 ± 0,02**	**2,70 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	-	0,14 ± 0,00	-
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,63 ± 0,00	0,64 ± 0,02	0,58 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,61 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,66 ± 0,03
Hidroksicimetna kis. (der. 3)	0,49 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,60 ± 0,00
Klorogenska kiselina	5,12 ± 0,00	2,72 ± 0,03	0,39 ± 0,00
p-kumarinska kiselina	0,64 ± 0,00	0,63 ± 0,04	0,50 ± 0,01
Ukupno (mg)	**7,49 ± 0,01**	**5,33 ± 0,02**	**2,73 ± 0,02**

Tablica 25. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A1) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,18 ± 0,02	0,78 ± 0,02	-
Delfinidin-3-glukozid	0,05 ± 0,01	0,23 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,10 ± 0,00	0,27 ± 0,00	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,11 ± 0,01	0,33 ± 0,01	-
Petunidin-3-galaktozid	0,15 ± 0,00	0,60 ± 0,02	-
Petunidin-3-glukozid	0,14 ± 0,00	0,47 ± 0,02	-
Peonidin-3-galaktozid	0,04 ± 0,03	0,16 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	-	-
Malvidin-3-galaktozid	2,52 ± 0,02	6,26 ± 0,06	-
Malvidin-3-glukozid	1,31 ± 0,00	3,12 ± 0,03	-
Malvidin-3-arabinozid	1,24 ± 0,01	3,40 ± 0,02	-
Ukupno (mg)	**5,83 ± 0,01**	**15,59 ± 0,02**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	1,44 ± 0,00	2,88 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 2)	0,16 ± 0,02	0,57 ± 0,02	-
Kvercetin (der. 3)	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	0,22 ± 0,00	0,43 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 4)	-	-	-
Kvercetin (der. 5)	0,52 ± 0,03	1,03 ± 0,02	0,52 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,43 ± 0,00
Kvercetin (der. 11)	-	-	0,44 ± 0,02
Ukupno (mg)	**2,47 ± 0,01**	**5,01 ± 0,02**	**1,39 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,36 ± 0,02	1,03 ± 0,02	0,61 ± 0,00
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,83 ± 0,03
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,49 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,78 ± 0,01	1,12 ± 0,04	0,98 ± 0,01
Klorogenska kiselina	-	0,19 ± 0,00	-
Kafeinska kiselina	-	0,11 ± 0,00	-
p-kumarinska kiselina	0,18 ± 0,02	0,31 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**1,80 ± 0,02**	**3,42 ± 0,02**	**6,81 ± 0,02**

Tablica 26. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A2) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,18 ± 0,01	0,55 ± 0,01	-
Delfinidin-3-glukozid	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,02	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,09 ± 0,00	0,19 ± 0,00	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,10 ± 0,01	0,22 ± 0,03	-
Petunidin-3-galaktozid	0,17 ± 0,01	0,44 ± 0,02	-
Petunidin-3-glukozid	0,12 ± 0,02	0,31 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,05 ± 0,00	0,11 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	-	-
Malvidin-3-galaktozid	2,02 ± 0,02	4,17 ± 0,04	-
Malvidin-3-glukozid	1,04 ± 0,06	1,97 ± 0,03	-
Malvidin-3-arabinozid	1,13 ± 0,00	2,2 ± 0,02	-
Ukupno (mg)	**4,95 ± 0,01**	**10,29 ± 0,02**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	1,43 ± 0,01	1,91 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 2)	0,41 ± 0,00	-	-
Kvercetin (der. 3)	-	0,13 ± 0,02	-
Kvercetin-3-glukozid	0,20 ± 0,00	0,29 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 4)	-	-	-
Kvercetin (der. 5)	0,40 ± 0,03	0,63 ± 0,01	0,19 ± 0001
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,25 ± 0,01
Kvercetin (der. 11)	-	-	0,32 ± 0,01
Ukupno (mg)	**2,44 ± 0,01**	**2,95 ± 0,01**	**0,75 ± 0,00**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,44 ± 0,01	0,82 ± 0,02	1,48 ± 0,01
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,54 ± 0,03
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,39 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,24 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,88 ± 0,00	0,72 ± 0,02	0,27 ± 0,03
p-kumarinska kiselina	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**2,02 ± 0,00**	**2,33 ± 0,02**	**6,53 ± 0,02**

Tablica 27. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A3) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,23 ± 0,00	1,29 ± 0,01	-
Delfinidin-3-glukozid	0,06 ± 0,01	0,34 ± 0,02	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,10 ± 0,00	0,85 ± 0,02	-
Petunidin-3-galaktozid	0,21 ± 0,01	0,96 ± 0,03	-
Petunidin-3-glukozid	0,16 ± 0,00	0,67 ± 0,00	-
Peonidin-3-galaktozid	0,05 ± 0,01	0,18 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	-	-
Malvidin-3-galaktozid	2,64 ± 0,01	7,98 ± 0,02	-
Malvidin-3-glukozid	1,31 ± 0,05	3,62 ± 0,02	-
Malvidin-3-arabinozid	1,35 ± 0,00	4,46 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**6,21 ± 0,01**	**20,73 ± 0,01**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	2,22 ± 0,03	3,96 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 2)	-	-	-
Kvercetin (der. 3)	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	0,26 ± 0,01	0,43 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 5)	0,52 ± 0,00	0,94 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,58 ± 0,01
Kvercetin (der. 11)	-	-	0,56 ± 0,00
Ukupno (mg)	**3,13 ± 0,01**	**5,54 ± 0,01**	**1,52 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,51 ± 0,00	0,99 ± 0,01	1,54 ± 0,03
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,77 ± 0,03
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,43 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,30 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,99 ± 0,00	0,91 ± 0,01	0,29 ± 0,00
p-kumarinska kiselina	-	0,44 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**1,93 ± 0,01**	**2,87 ± 0,01**	**6,90 ± 0,01**

Tablica 28. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A4) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,52 ± 0,01	1,87 ± 0,01	-
Delfinidin-3-glukozid	0,15 ± 0,04	0,51 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,18 ± 0,03	0,55 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,29 ± 0,02	0,93 ± 0,03	-
Petunidin-3-galaktozid	0,43 ± 0,00	1,36 ± 0,02	-
Petunidin-3-glukozid	0,30 ± 0,00	0,91 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	0,63 ± 0,00	-
Malvidin-3-galaktozid	4,24 ± 0,04	8,81 ± 0,01	0,58 ± 0,00
Malvidin-3-glukozid	2,05 ± 0,00	4,45 ± 0,03	-
Malvidin-3-arabinozid	2,19 ± 0,01	5,34 ± 0,04	-
Ukupno (mg)	**10,45 ± 0,02**	**25,57 ± 0,01**	**0,58 ± 0,00**
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	3,31 ± 0,02	4,69 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 2)	-	0,46 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	-	0,31 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 5)	0,71 ± 0,01	1,39 ± 0,00	0,49 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	2,34 ± 0,01
Ukupno (mg)	**4,63 ± 0,01**	**7,46 ± 0,01**	**2,83 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,46 ± 0,01	0,60 ± 0,00	-
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,43 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,54 ± 0,00	0,66 ± 0,01	0,37 ± 0,02
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,07 ± 0,06	1,25 ± 0,01	0,56 ± 0,02
Klorogenska kiselina	0,55 ± 0,01	1,33 ± 0,03	2,46 ± 0,03
Kafeinska kiselina	-	0,08 ± 0,02	-
p-kumarinska kiselina	0,41 ± 0,03	0,23 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**3,03 ± 0,02**	**4,14 ± 0,01**	**7,81 ± 0,02**

Tablica 29. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A5) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,41 ± 0,01	4,54 ± 0,05	-
Delfinidin-3-glukozid	0,10 ± 0,00	1,31 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,18 ± 0,00	0,89 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,16 ± 0,01	3,10 ± 0,02	-
Petunidin-3-galaktozid	0,34 ± 0,04	3,11 ± 0,00	-
Petunidin-3-glukozid	0,29 ± 0,01	2,06 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,11 ± 0,00	0,58 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	0,18 ± 0,01	2,20 ± 0,00	-
Malvidin-3-galaktozid	3,96 ± 0,00	15,62 ± 0,03	-
Malvidin-3-glukozid	2,19 ± 0,01	7,77 ± 0,01	-
Malvidin-3-arabinozid	2,11 ± 0,02	10,50 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**10,01 ± 0,01**	**51,65 ± 0,01**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	3,01 ± 0,00	5,82 ± 0,04	-
Kvercetin (der. 2)	0,19 ± 0,01	0,55 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	0,26 ± 0,02	-	-
Kvercetin-3-glukozid	0,35 ± 0,02	1,20 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 4)	-	0,10 ± 0,00	-
Kvercetin (der. 5)	0,78 ± 0,01	1,73 ± 0,03	0,55 ± 0,00
Kvercetin (der. 7)	-	-	1,42 ± 0,01
Ukupno (mg)	**4,60 ± 0,01**	**9,39 ± 0,01**	**1,97 ± 0,00**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,37 ± 0,01	0,22 ± 0,00	1,64 ± 0,04
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	5,51 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,65 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,23 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,21 ± 0,02	1,37 ± 0,04	0,43 ± 0,02
Klorogenska kiselina	-	0,36 ± 0,01	-
Kafeinska kiselina	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	-
p-kumarinska kiselina	0,52 ± 0,01	0,55 ± 0,02	-
Ukupno (mg)	**2,87 ± 0,03**	**3,26 ± 0,01**	**7,81 ± 0,02**

Tablica 30. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A6) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,42 ± 0,02	4,29 ± 0,01	-
Delfinidin-3-glukozid	0,10 ± 0,01	1,17 ± 0,03	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,20 ± 0,01	0,98 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,15 ± 0,00	3,50 ± 0,01	-
Petunidin-3-galaktozid	0,35 ± 0,03	3,03 ± 0,00	-
Petunidin-3-glukozid	0,28 ± 0,01	1,89 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,14 ± 0,01	0,54 ± 0,01	-
Peonidin-3-glukozid	-	1,93 ± 0,00	-
Malvidin-3-galaktozid	4,35 ± 0,02	14,48 ± 0,04	-
Malvidin-3-glukozid	2,24 ± 0,02	7,10 ± 0,02	-
Malvidin-3-arabinozid	2,14 ± 0,01	9,60 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**10,35 ± 0,02**	**48,48 ± 0,01**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	4,15 ± 0,04	5,72 ± 0,06	-
Kvercetin (der. 3)	0,19 ± 0,00	0,30 ± 0,00	-
Kvercetin-3-glukozid	0,48 ± 0,00	0,66 ± 0,02	-
Kvercetin (der. 5)	0,87 ± 0,00	1,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,73 ± 0,00
Ukupno (mg)	**5,69 ± 0,01**	**8,11 ± 0,02**	**1,16 ± 0,00**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,44 ± 0 ,01	0,57 ± 0,02	1,66 ± 0,02
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	5,43 ± 0,04
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,71 ± 0,00	0,64 ± 0,02	0,20 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,23 ± 0,00	1,21 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Klorogenska kiselina	-	0,38 ± 0,00	-
p-kumarinska kiselina	0,77 ± 0,01	0,31 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**3,14 ± 0,00**	**3,10 ± 0,01**	**7,67 ± 0,01**

Tablica 31. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A7) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,35 ± 0,03	4,32 ± 0,12	-
Delfinidin-3-glukozid	0,10 ± 0,00	1,15 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,15 ± 0,00	0,82 ± 0,03	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,15 ± 0,00	3,05 ± 0,04	-
Petunidin-3-galaktozid	0,32 ± 0,01	2,92 ± 0,03	-
Petunidin-3-glukozid	0,26 ± 0,02	1,84 ± 0,02	-
Peonidin-3-galaktozid	0,09 ± 0,01	0,55 ± 0,01	-
Peonidin-3-glukozid	0,12 ± 0,02	2,12 ± 0,03	-
Malvidin-3-galaktozid	3,14 ± 0,00	14,02 ± 0,03	-
Malvidin-3-glukozid	1,82 ± 0,03	6,75 ± 0,01	-
Malvidin-3-arabinozid	1,77 ± 0,00	9,62 ± 0,04	-
Ukupno (mg)	**8,27 ± 0,01**	**47,13 ± 0,03**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	3,00 ± 0,01	5,33 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	0,15 ± 0,04	-	-
Kvercetin-3-glukozid	0,25 ± 0,04	0,87 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 5)	0,55 ± 0,00	1,21 ± 0,02	0,49 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	1,39 ± 0,01
Ukupno (mg)	**3,95 ± 0,02**	**7,40 ± 0,01**	**1,87 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,12 ± 0,00	0,34 ± 0,01	1,43 ± 0,01
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,67 ± 0,03
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,45 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,81 ± 0,02	1,06 ± 0,02	0,33 ± 0,02
p-kumarinska kiselina	0,31 ± 0,01	0,37 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**1,70 ± 0,01**	**2,28 ± 0,02**	**6,62 ± 0,02**

Tablica 32. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A8) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,71 ± 0,01	2,46 ± 0,06	-
Delfinidin-3-glukozid	0,08 ± 0,01	0,61 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,18 ± 0,02	0,68 ± 0,01	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,19 ± 0,01	1,74 ± 0,02	-
Petunidin-3-galaktozid	0,30 ± 0,00	1,72 ± 0,00	-
Petunidin-3-glukozid	0,21 ± 0,01	1,11 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,01	-
Peonidin-3-glukozid	-	0,72 ± 0,00	-
Malvidin-3-galaktozid	3,62 ± 0,03	9,43 ± 0,04	-
Malvidin-3-glukozid	1,86 ± 0,02	4,71 ± 0,04	-
Malvidin-3-arabinozid	1,80 ± 0,03	5,99 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**9,04 ± 0,02**	**29,35 ± 0,02**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	3,43 ± 0,01	4,96 ± 0,02	-
Kvercetin (der. 3)	0,14 ± 0,00	0,23 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	0,42 ± 0,00	0,64 ± 0,02	-
Kvercetin (der. 5)	0,75 ± 0,03	1,03 ± 0,00	0,33 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,47 ± 0,01
Ukupno (mg)	**4,74 ± 0,01**	**6,85 ± 0,01**	**0,79 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	-	0,56 ± 0,00	1,33 ± 0,02
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,18 ± 0,04
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,57 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,25 ± 0,01	1,09 ± 0,01	0,31 ± 0,00
Klorogenska kiselina	-	0,35 ± 0,04	-
p-kumarinska kiselina	0,42 ± 0,03	-	-
Ukupno (mg)	**2,24 ± 0,02**	**2,54 ± 0,02**	**5,97 ± 0,02**

Tablica 33. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A9) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

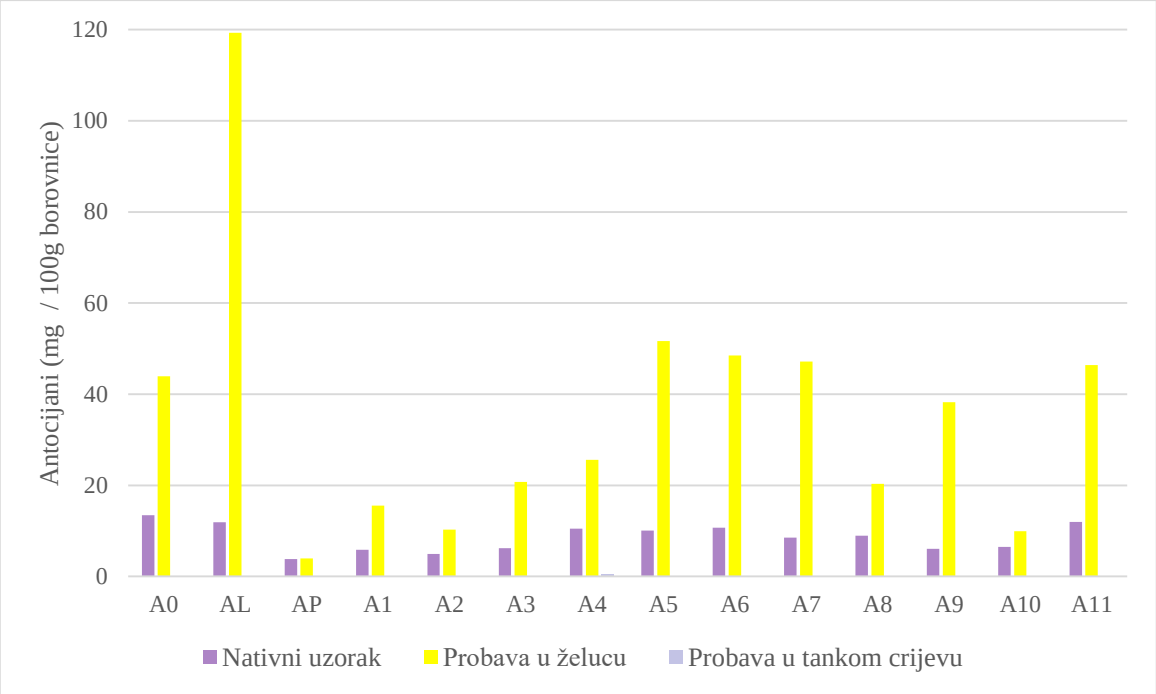
	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,26 ± 0,03	3,59 ± 0,02	-
Delfinidin-3-glukozid	0,04 ± 0,00	0,81 ± 0,01	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,11 ± 0,01	0,74 ± 0,03	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,11 ± 0,00	3,01 ± 0,01	-
Petunidin-3-galaktozid	0,21 ± 0,01	2,51 ± 0,01	-
Petunidin-3-glukozid	0,15 ± 0,00	1,46 ± 0,04	-
Peonidin-3-galaktozid	0,07 ± 0,00	0,35 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	0,08 ± 0,01	1,53 ± 0,01	-
Malvidin-3-galaktozid	2,46 ± 0,02	11,48 ± 0,04	-
Malvidin-3-glukozid	1,31 ± 0,00	5,23 ± 0,03	-
Malvidin-3-arabinozid	1,26 ± 0,00	7,54 ± 0,01	-
Ukupno (mg)	**6,06 ± 0,01**	**38,22 ± 0,02**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	2,53 ± 0,00	4,08 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 3)	-	0,17 ± 0,00	-
Kvercetin-3-glukozid	0,39 ± 0,01	0,56 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 5)	0,53 ± 0,01	1,04 ± 0,02	0,31 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	0,88 ± 0,01
Ukupno (mg)	**3,46 ± 0,01**	**5,84 ± 0,01**	**1,19 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,24 ± 0,00	0,55 ± 0,01	1,50 ± 0,01
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,69 ± 0,01
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,14 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,95 ± 0,00	0,66 ± 0,01	0,63 ± 0,00
Ukupno (mg)	**1,59 ± 0,00**	**1,63 ± 0,01**	**6,96 ± 0,01**

Tablica 34. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A10) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,26 ± 0,00	0,86 ± 0,01	-
Delfinidin-3-glukozid	0,04 ± 0,00	0,19 ± 0,00	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,11 ± 0,00	0,13 ± 0,00	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,10 ± 0,00	0,56 ± 0,01	-
Petunidin-3-galaktozid	0,22 ± 0,00	0,58 ± 0,00	-
Petunidin-3-glukozid	0,16 ± 0,00	0,34 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,06 ± 0,01	0,05± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	-	-
Malvidin-3-galaktozid	2,82 ± 0,08	3,61 ± 0,02	-
Malvidin-3-glukozid	1,36 ± 0,00	1,46 ± 0,02	-
Malvidin-3-arabinozid	1,36 ± 0,05	2,16 ± 0,04	-
Ukupno (mg)	**6,50 ± 0,02**	**9,92 ± 0,01**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	2,56 ± 0,01	1,23 ± 0,03	-
Kvercetin-3-glukozid	0,32 ± 0,01	0,15 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 5)	0,55 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	1,08 ± 0,01
Ukupno (mg)	**3,42 ± 0,01**	**1,67 ± 0,01**	**1,46 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,47 ± 0,01	0,29 ± 0,01	1,39 ± 0,02
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,15 ± 0,04
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,44 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,17 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	1,00 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,72 ± 0,01
Ukupno (mg)	**1,92 ± 0,01**	**0,62 ± 0,01**	**6,43 ± 0,02**

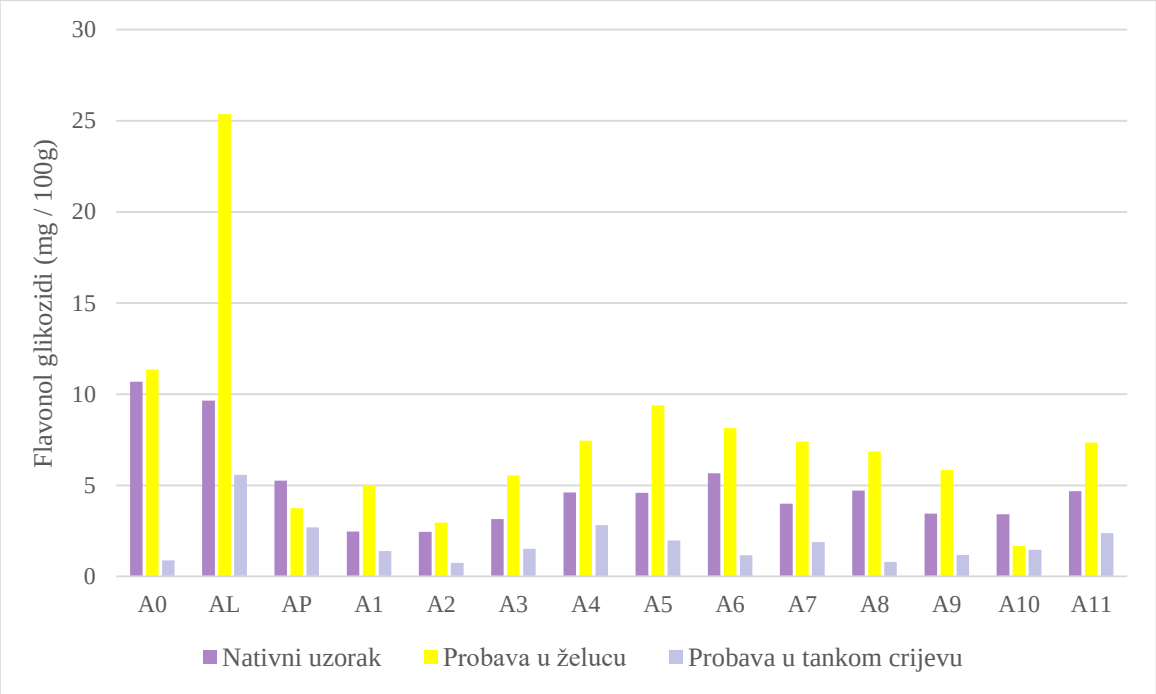
Tablica 35. Koncentracija antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorku ultrazvučno tretirane borovnice (A11) prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave određena HPLC/UV/Vis/PDA tehnikom (mg/100 g borovnice)

	Nativni uzorak	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
Antocijani			
Delfinidin-3-galaktozid	0,66 ± 0,00	4,66 ± 0,06	-
Delfinidin-3-glukozid	0,13 ± 0,00	1,20 ± 0,02	-
Cijanidin-3-galaktozid	0,28 ± 0,02	0,93 ± 0,02	-
Delfinidin-3-arabinozid	0,40 ± 0,01	3,67 ± 0,02	-
Petunidin-3-galaktozid	0,52 ± 0,02	3,17 ± 0,01	-
Petunidin-3-glukozid	0,30 ± 0,05	1,78 ± 0,01	-
Peonidin-3-galaktozid	0,12 ± 0,02	0,22 ± 0,00	-
Peonidin-3-glukozid	-	1,39 ± 0,01	-
Malvidin-3-galaktozid	4,78 ± 0,01	13,90 ± 0,11	-
Malvidin-3-glukozid	2,31 ± 0,02	6,20 ± 0,01	-
Malvidin-3-arabinozid	2,54 ± 0,02	9,29 ± 0,04	-
Ukupno (mg)	**12,00 ± 0,02**	**46,38 ± 0,03**	-
Flavonol glikozidi			
Kvercetin (der. 1)	3,41 ± 0,03	5,16 ± 0,05	-
Kvercetin (der. 3)	0,14 ± 0,00	0,21 ± 0,01	-
Kvercetin-3-glukozid	0,43 ± 0,01	0,71 ± 0,01	-
Kvercetin (der. 5)	0,71 ± 0,01	1,30 ± 0,00	0,59 ± 0,01
Kvercetin (der. 7)	-	-	1,80 ± 0,01
Ukupno (mg)	**4,69 ± 0,01**	**7,37 ± 0,02**	**2,38 ± 0,01**
Fenolne kiseline			
Hidroksibenzojeva kis. (der. 1)	0,42 ± 0,02	0,62 ± 0,02	1,44 ± 0,01
Hidroksibenzojeva kis. (der. 2)	-	-	4,28 ± 0,04
Hidroksicimetna kis. (der. 1)	0,48 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,17 ± 0,00
Hidroksicimetna kis. (der. 2)	0,94 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,34 ± 0,02
Klorogenska kiselina	0,27 ± 0,00	0,70 ± 0,00	-
Ukupno (mg)	**2,10 ± 0,02**	**2,81 ± 0,01**	**6,22 ± 0,02**



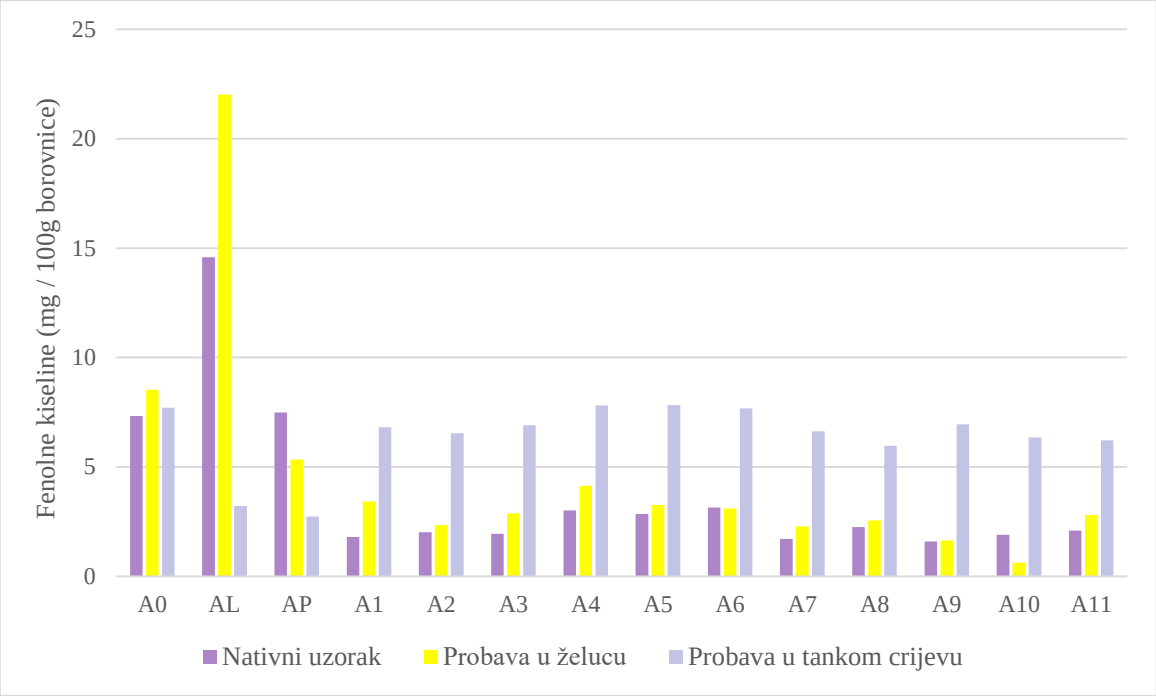
Slika 21. Udio antocijana u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su prikazani kao zbroj pojedinačno identificiranih antocijana.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 22. Udio flavonol glikozida u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su prikazani kao zbroj pojedinačno identificiranih flavonol glikozida.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 23. Udio fenolnih kiselina u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

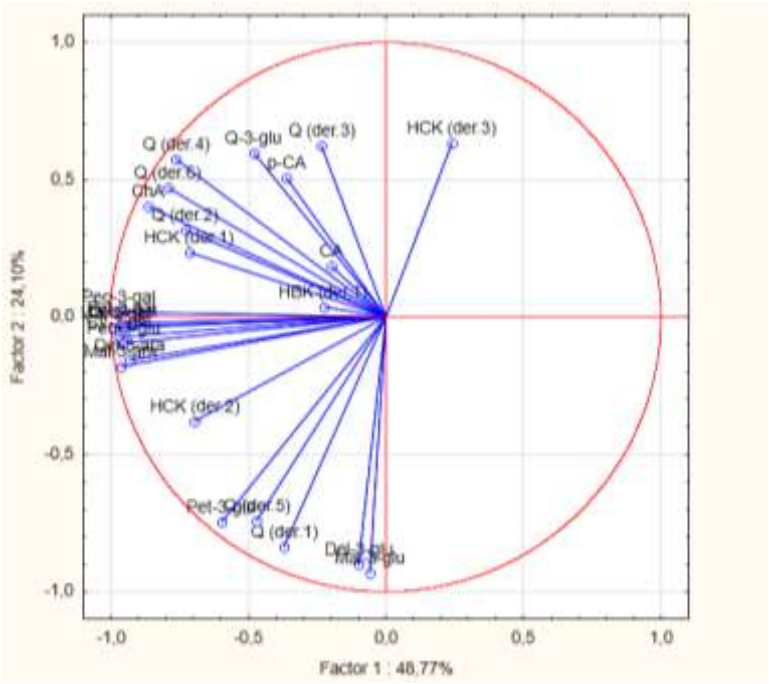
Rezultati su prikazani kao zbroj pojedinačno identificiranih fenolnih kiselina.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 36. Utjecaj primjenjenih metoda obrade i *in vitro* probave na sadržaj ukupnih fenola i pojedinih skupina fenolnih spojeva borovnice

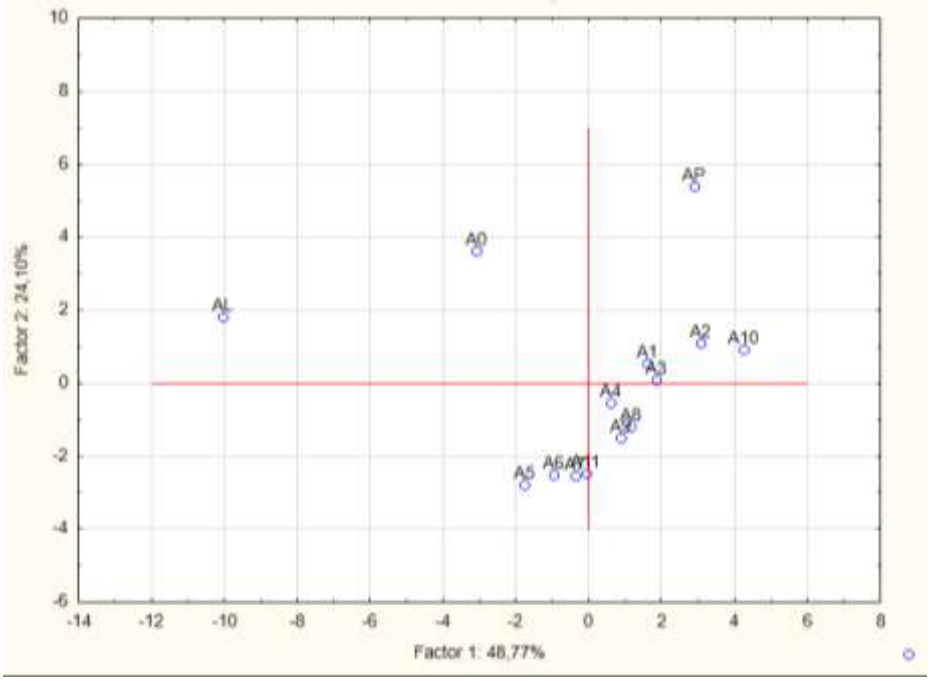
Fenoli	**Varijabla**	**p-vrijednost**
Ukupni fenoli	metoda obrade	*<0,001*
	in vitro probava	*0,026*
Antocijani	metoda obrade	ns
	in vitro probava	*<0,001*
Flavonol glikozida	metoda obrade	ns
	in vitro probava	*<0,001*
Fenolne kiseline	metoda obrade	*0,008*
	in vitro probava	*0,007*

Statistički značajna razlika određena analizom varijance (ANOVA).

Rezultati određivanja fenolnih skupina prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave analizirani su primjenom metode glavnih komponenata (PCA) s ciljem određivanja karakterističnih fenolnih spojeva za pojedini ispitivani uzorak s obzirom na korištene metode obrade. Rezultati PCA analize nakon *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu prikazani su na Slikama 24. i 25.

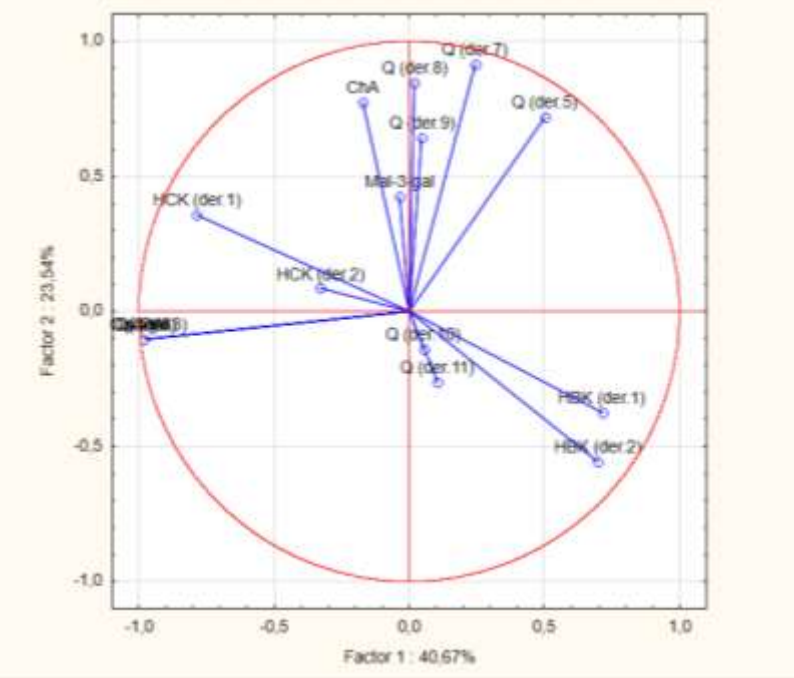


(a)

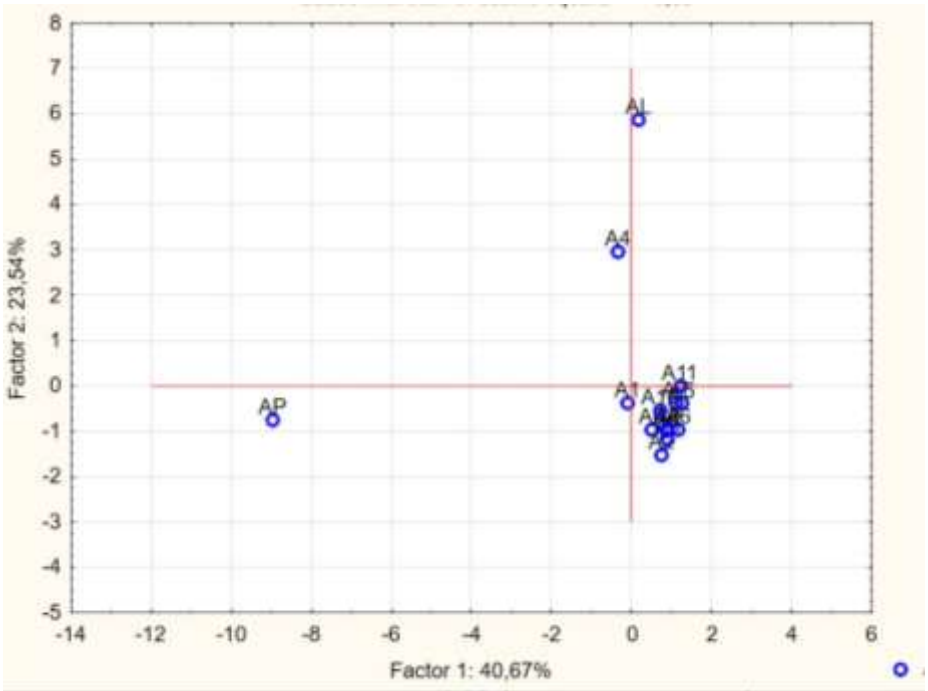


(b)

Slika 24. PC1 *vs.* PC2 nakon provedene *in vitro* probave u želucu za pojedinačne fenolne spojeve (a) u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice (b).



(a)



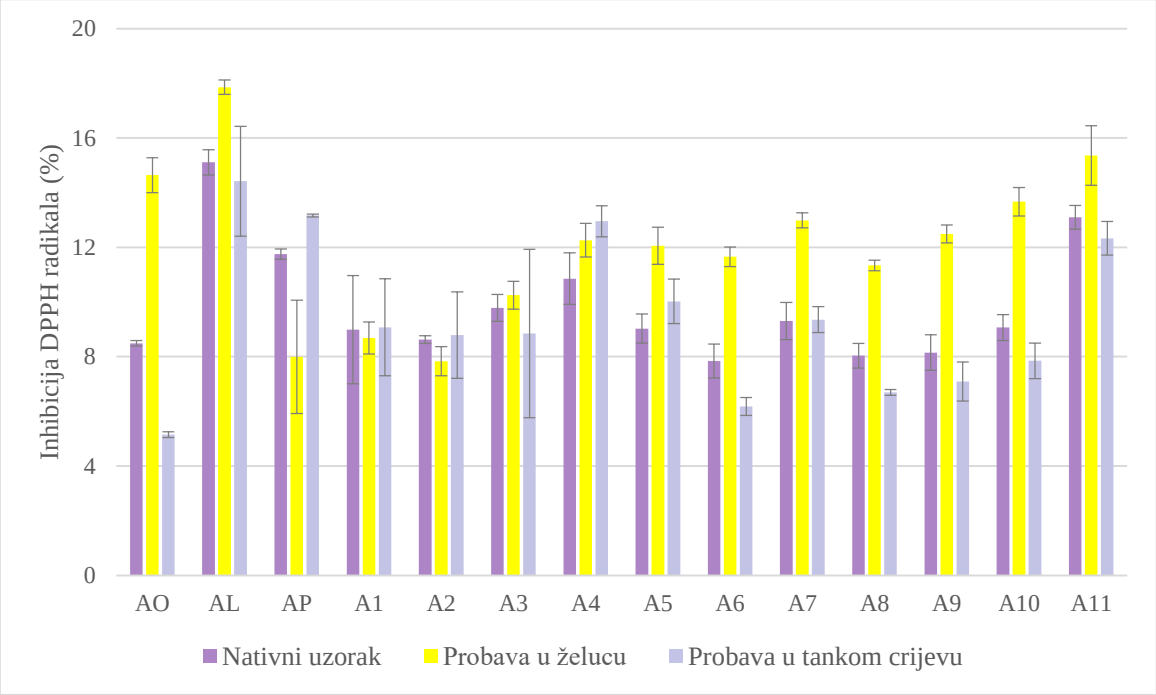
(b)

Slika 25. PC1 *vs.* PC2 nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu za pojedinačne fenolne spojeve (a) u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice (b).

4.3.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave

Antioksidacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave određena je DPPH i FRAP metodama, a rezultati su prikazani na Slikama 26. i 27. Korelacija između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama nakon *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu prikazana je u Tablicama 41. i 42.

Utjecaj primjenjenih metoda obrade i *in vitro* probave na antioksidacijsku aktivnost određena je analizom varijance, a rezultati su prikazani u Tablici 43.



Slika 26. Antioksidacijska aktivnost netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu izražena postotkom inhibicije DPPH radikala

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD), a izraženi kao % inhibicije DPPH radikala na 100g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 37. Utjecaj *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom

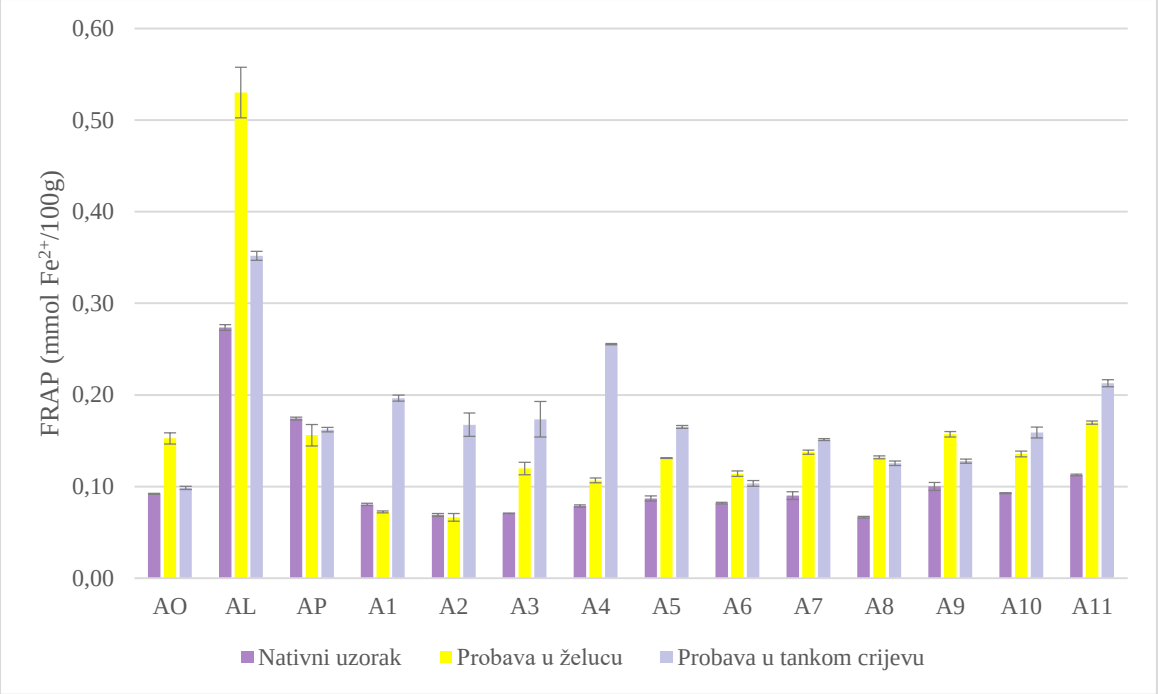
	Nativni *vs.* probava u želucu		Nativni *vs.* probava u tankom crijevu	
	% stabilnosti	p-vrijednost	% stabilnosti	p-vrijednost
A0	+ 72,45	*0,003*	– 39,35	*<0,001*
AL	+ 18,20	*0,005*	– 4,57	ns
AP	– 32,03	ns	+ 11,97	*0,005*
A1	– 3,42	ns	+ 0,96	ns
A2	– 9,16	ns	+ 1,96	ns
A3	+ 4,73	ns	– 9,59	ns
A4	+ 12,95	ns	+ 19,33	ns
A5	+ 33,57	*<0,001*	+ 11,03	ns
A6	+ 48,67	*0,018*	– 21,18	*0,046*
A7	+ 39,53	*<0,001*	+ 0,55	ns
A8	+ 41,15	*0,008*	– 16,69	*<0,001*
A9	+ 53,27	*0,016*	– 12,95	ns
A10	+ 50,75	*0,004*	– 13,43	ns
A11	+ 17,25	*0,027*	– 5,86	ns

Statistička obrada podataka sa Slike 26. Statistički značajna razlika određena t-testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 38. Testiranje značajnosti razlika između antioksidacijske aktivnosti s obzirom na metodu obrade nakon provedene *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
A0	b, c	a
AL	a	c
AP	g	c, d
A1	g, h	e, f, g, h
A2	g	e, f, g, h
A3	h, i	e, h, k
A4	f, k	c, d
A5	f, k	f, g, j
A6	j, k	a, b
A7	d, e	g, k
A8	i, j	b, i
A9	e, f	b, i
A10	c, d	h, i
A11	a, b	d, j
p-vrijednost	*<0,001*	*<0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 26. Različita slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku. Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 27. Redukcijska aktivnost netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu određena FRAP metodom

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD), a izraženi u mmol Fe^{2+}/L na 100g borovnice.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 39. Utjecaj *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu na antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom

	Nativni *vs.* probava u želucu		Nativni *vs.* probava u tankom crijevu	
	% stabilnosti	p-vrijednost	% stabilnosti	p-vrijednost
A0	+ 65,60	*0,003*	+ 6,98	*0,003*
AL	+ 93,76	*0,003*	+ 28,58	*0,019*
AP	– 10,41	ns	– 6,91	ns
A1	– 9,98	ns	+ 144,22	*<0,001*
A2	– 3,82	ns	+ 142,68	*0,006*
A3	+ 69,63	*0,006*	+ 145,63	*0,012*
A4	+ 35,25	*0,004*	+ 223,67	*<0,001*
A5	+ 50,36	*0,002*	+ 89,76	*<0,001*
A6	+ 39,35	*0,004*	+ 26,31	*0,008*
A7	+ 52,66	*0,004*	+ 67,88	*0,002*
A8	+ 98,49	*<0,001*	+ 88,42	*<0,001*
A9	+ 57,00	*0,005*	+ 27,57	*0,019*
A10	+ 46,18	*0,002*	+ 71,28	*0,003*
A11	+ 50,88	*<0,001*	+ 88,99	*<0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 27. Statistički značajna razlika određena t-testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 40. Testiranje značajnosti razlika između redukcijske aktivnosti s obzirom na metodu obrade nakon provedene probave u želucu i tankom crijevu

	Probava u želucu	Probava u tankom crijevu
A0	b	b
AL	a	f
AP	b	a
A1	c, d	h
A2	c	a
A3	e	a
A4	d	f, g
A5	f	a
A6	e	b, c
A7	g	e
A8	f	c, d
A9	b	d, e
A10	g	a
A11	a	g, h
p-vrijednost	*<0,001*	*<0,001*

Statistička obrada podataka sa Slike 27. Različita slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku. Statistički značajna razlika određena Kruskal Wallis testom.
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 41. Koeficijenti korelacije između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) nakon *in vitro* probave u želucu

	Ukupni fenoli	Antocijani	Fenolne kis.	Flavonol glikozidi
FRAP	0,947**	0,847**	0,915**	0,890**
DPPH	0,731*	0,798*	0,564*	0,714*

* statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,05$)
** statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,001$)

Tablica 42. Koeficijenti korelacije između ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina te antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) nakon *in vitro* probave u tankom crijevu

	Ukupni fenoli	Antocijani	Fenolne kis.	Flavonol glikozidi
FRAP	0,808**	0,369	-0,441	0,878**
DPPH	0,610*	0,357	-0,595*	0,846**

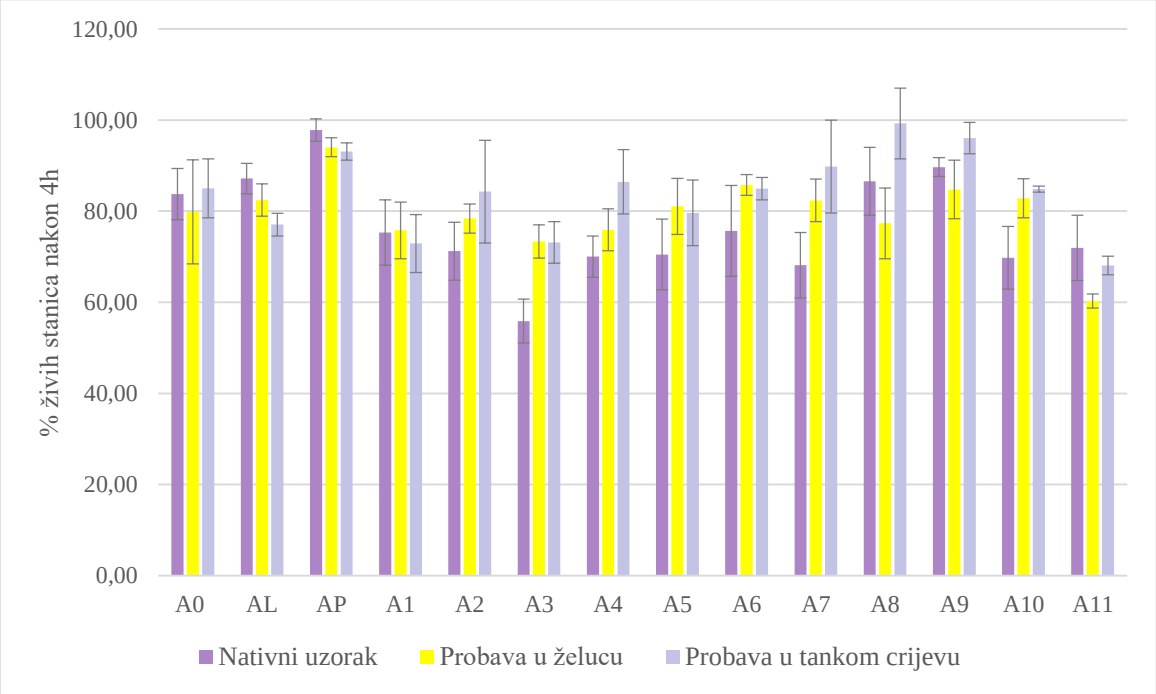
* statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,05$)
** statistički značajna korelacijska povezanost ($p<0,001$)

Tablica 43. Utjecaj primjenjenih metoda obrade i *in vitro* probave na antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva borovnice

Antioksidacijska aktivnost	**Varijabla**	**p-vrijednost**
DPPH	metoda obrade	*0,017*
	in vitro probava	*0,024*
FRAP	metoda obrade	*<0,001*
	in vitro probava	*0,003*

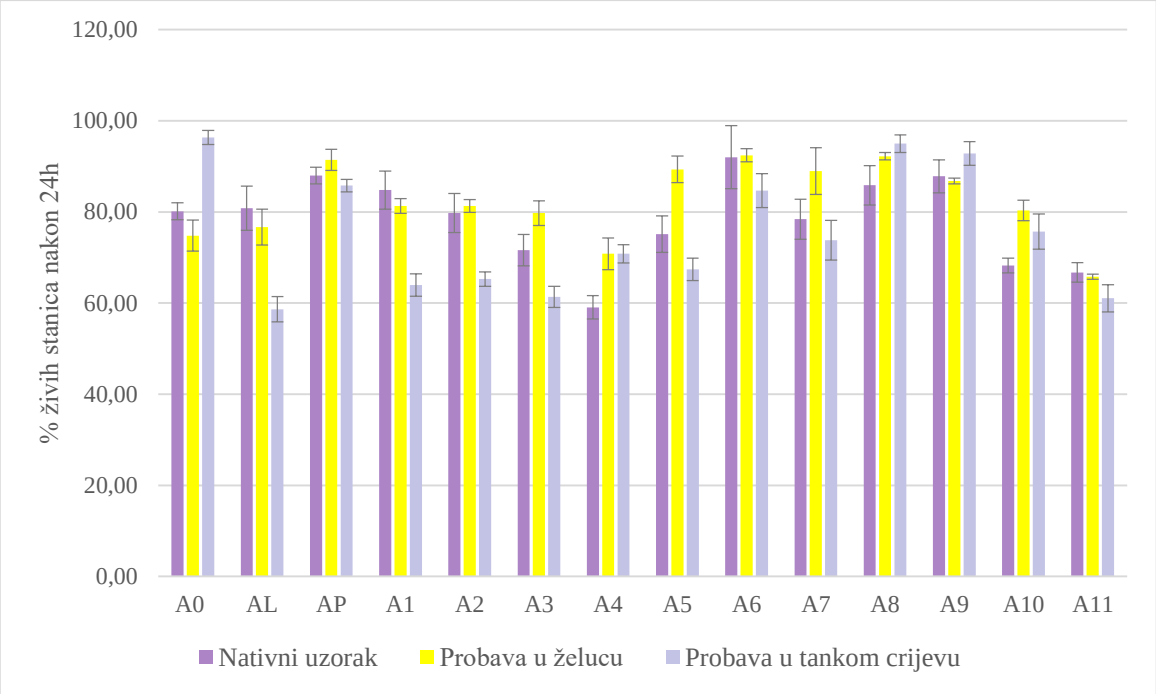
4.3.3. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave

Antiproliferacijska aktivnost uzoraka borovnice određena je MTT testom na odabranim stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) nakon perioda od 4, 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani na Slikama 28. do 31.



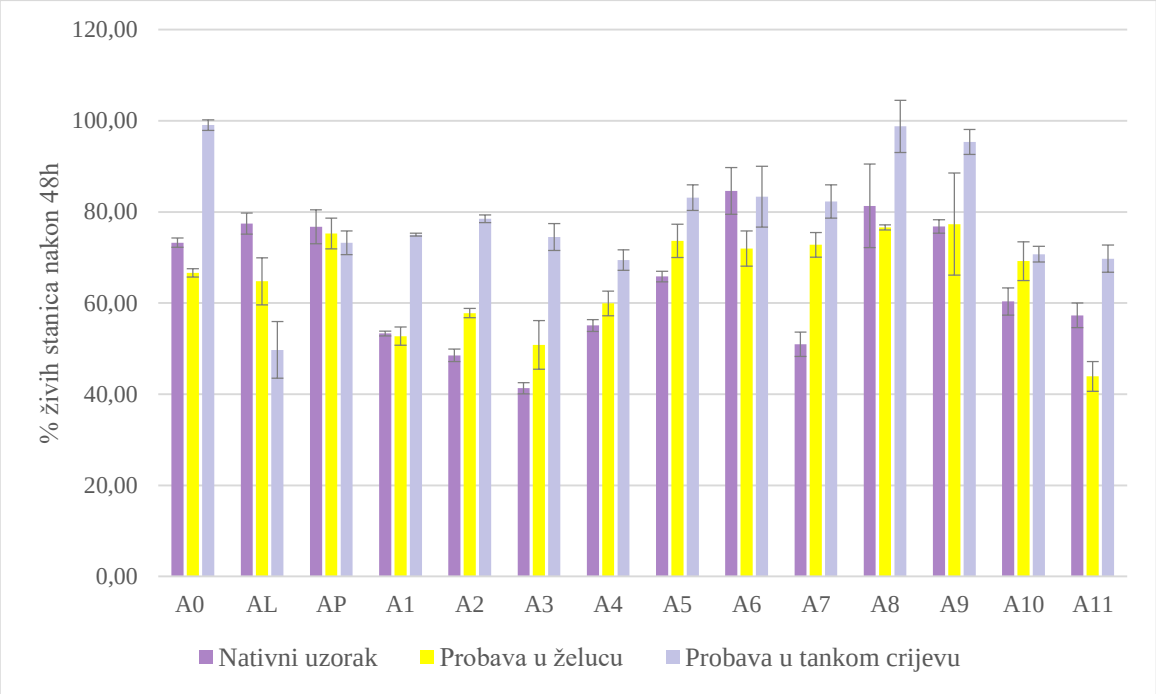
Slika 28. Antiproliferacijska aktivnost određena MTT testom nakon 4 sata za uzorke prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD).
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



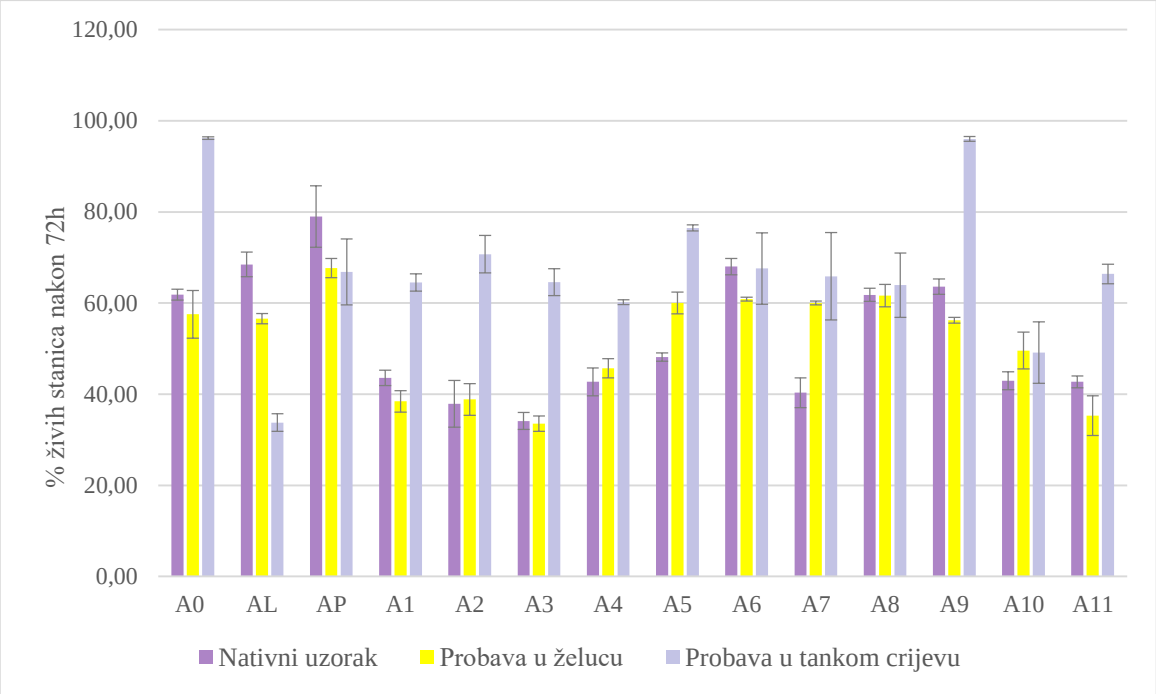
Slika 29. Antiproliferacijska aktivnost određena MTT testom nakon 24 sata za uzorke prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD).
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 30. Antiproliferacijska aktivnost određena MTT testom nakon 48 sati za uzorke prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD).
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).



Slika 31. Antiproliferacijska aktivnost određena MTT testom nakon 72 sata za uzorke prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± standardna devijacija (SD).
Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

Tablica 44. Testiranje značajnosti razlika između uzoraka prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu nakon 4, 24, 48 i 72 sata

	4h	**24h**	**48h**	**72h**	p-vrijednost
Nativni uzorak	a BC	a B	a AC	a A	*0,001*
Probava u želucu	a C	a C	a B	a A	*0,001*
Probava u tankom crijevu	a B	a AB	b AB	b A	*0,013*
p-vrijednost	ns	ns	*0,007*	*0,007*	

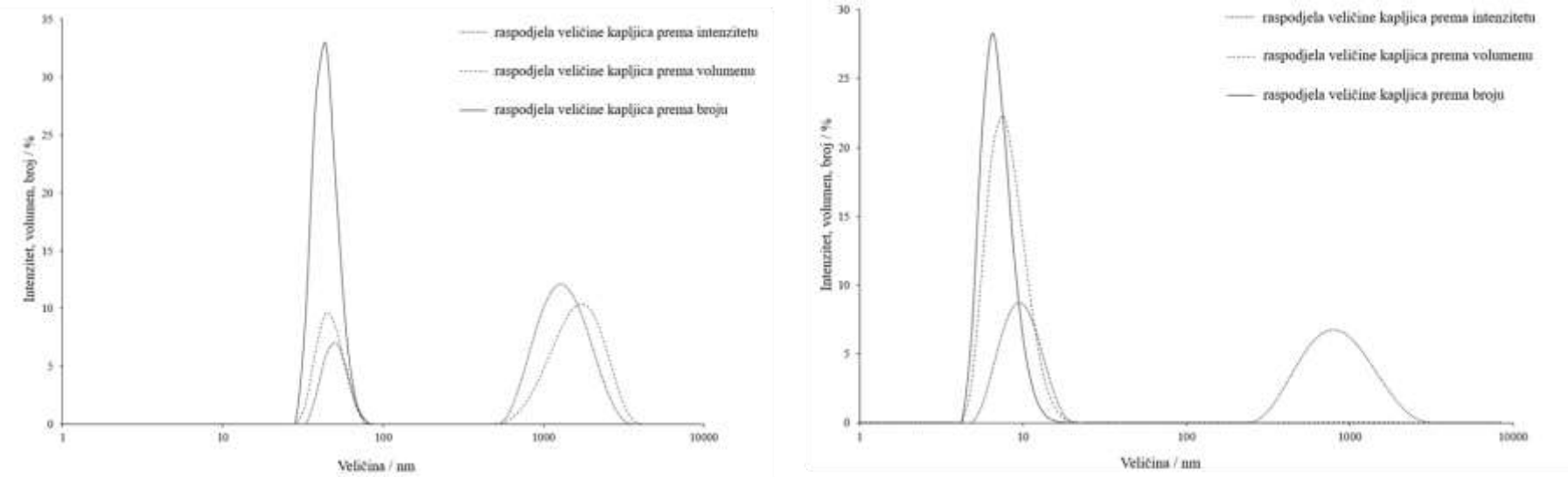
Statistička obrada podataka iz Slika 28–31. Različita mala slova unutar istog stupca ukazuju na statistički značajnu razliku prije i nakon *in vitro* probave za pojedino vrijeme tretiranja, a različita velika slova unutar reda ukazuju na statistički značajnu razliku kroz vrijeme tretiranja staničnih linija MDA-MB-231. Statistički značajna razlika određena analizom varijance (ANOVA).

4.4. Utjecaj inkapsulacije na antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva borovnice

Ekstrakti borovnice inkapsulirani su u dvije vrste mikroemulzija i liposome, a njihova karakterizacija prikazana je na Slikama 32. i 33. Antioksidacijska aktivnost inkapsuliranih ekstrakata ispitana je Rancimat metodom, a rezultati su prikazani u Tablici 45.

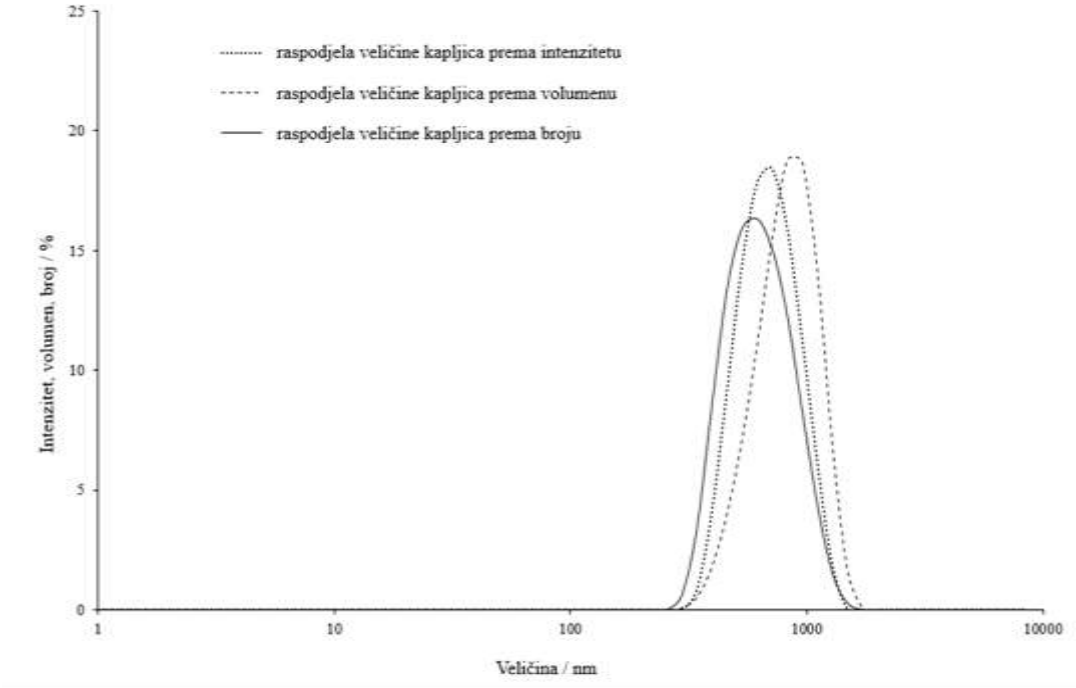
4.4.1. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma

a) b)



Mikroemulzija	Refrakcijski indeks	Zeta-potencijal (mV)	Konduktivnost (mS/cm)	Površinska napetost (mN/m)	Visokznost (cP)
ME-1	1,462	-7,16	0,035	32,2	907
ME-2	1,451	-2,11	0,028	31,67	1105

Slika 32. Raspodjela veličine kapljica prema intenzitetu, volumenu i broju za mikroemulzijske uzorke a) ME-1 i b) ME-2 kao i refrakcijski indeks, zeta-potencijal, konduktivnost, površinska napetost i viskoznost



	Zeta-potencijal (mV)	Konduktivnost (mS/cm)
Liposomi	-39,31 ± 0,9	0,0088 ± 0,01

Slika 33. Raspodjela veličine kapljica prema intenzitetu, volumenu i broju za liposome kao i zeta-potencijal i konduktivnost

4.4.2. Učinak inkapsuliranih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Tablica 45. Produženje indukcijskog vremena ekstra djevičanskog maslinovog ulja (EDMU) s dodanim ekstraktima inkapsuliranim u mikroemulzije (ME-1 i ME-2) i liposome

Uzorci	ME-1		ME-2		Liposomi
	Mehanička homogenizacija	Ultrazvučna homogenizacija	Mehanička homogenizacija	Ultrazvučna homogenizacija	
A0	3,90 ± 0,31 *	3,45 ± 0,20 *	1,20 ± 0,06	5,78 ± 0,28 *	3,05 ± 0,11 *
AP	0,78 ± 0,31	2,77 ± 0,13 *	4,62 ± 0,33 *	5,76 ± 0,17 *	8,87 ± 0,20 *
AL	2,88 ± 0,06 *	7,42 ± 0,07 *	1,99 ± 0,20 *	5,55 ± 0,06 *	3,63 ± 0,14 *
A1	3,46 ± 0,07 *	9,89 ± 0,21 *	1,39 ± 0,07 *	6,86 ± 0,23 *	2,27 ± 0,21
A2	4,72 ± 0,31 *	10,29 ± 0,16 *	4,35 ± 0,33 *	3,71 ± 0,17	3,24 ± 0,40 *
A3	9,91 ± 0,27 *	3,73 ± 0,11 *	7,42 ± 0,31 *	9,68 ± 0,18 *	3,40 ± 0,20 *
A4	4,72 ± 0,17 *	15,15 ± 0,18 *	4,71 ± 0,07 *	11,02 ± 0,13 *	4,34 ± 0,13 *
A5	10,22 ± 0,20 *	11,16 ± 0,11 *	4,89 ± 0,11 *	5,14 ± 0,34 *	3,19 ± 0,31 *
A6	1,86 ± 0,31 *	12,71 ± 0,17 *	6,07 ± 0,10 *	12,27 ± 0,34 *	2,54 ± 0,20
A7	3,95 ± 0,38 *	5,21 ± 0,06 *	3,01 ± 0,33 *	6,73 ± 0,24 *	2,67 ± 0,28 *
A8	3,49 ± 0,35 *	2,80 ± 0,14 *	1,43 ± 0,33 *	4,05 ± 0,31 *	2,81 ± 0,24 *
A9	4,06 ± 0,13 *	8,05 ± 0,20 *	2,93 ± 0,30 *	8,26 ± 0,35 *	2,81 ± 0,16 *
A10	6,91 ± 0,17 *	14,18 ± 0,13 *	8,50 ± 0,14 *	8,25 ± 0,23 *	3,14 ± 0,27 *
A11	2,69 ± 0,11 *	5,19 ± 0,21*	4,30 ± 0,20 *	13,26 ± 0,13 *	2,58 ± 0,14
p-vrijednost	*0,012*	*0,011*	*0,012*	*0,011*	*0,021*

Rezultati su srednja vrijednost tri određivanja ± SD. Vrijednosti označene sa * unutar stupca statistički se značajno razlikuju od kontrolnog uzorka (vrijeme indukcije čistog EDMU = 10,43h; vrijeme indukcije EDMU s mehanički homogeniziranom emulzijom = 9,41h; vrijeme indukcije EDMU s ultrazvučno homogeniziranom emulzijom = 13,28h; vrijeme indukcije EDMU s liposomima = 6,98h). Statistički značajna razlika određena Kruskal-Wallis testom. Oznake uzoraka: A0 = netretirana borovnica; AL = liofilizirana borovnica; AP = pasterizirana borovnica; A1-A11 = ultrazvučno tretirana borovnica (prema parametrima prikazanim u Tablici 4.).

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj metoda obrade na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost fenola borovnice

Dosadašnja istraživanja potvrdila su značajan utjecaj obrade borovnica na fenolne spojeve (Michalska i Łysiak, 2015) i antioksidacijsku aktivnost (Mejía-Meza i sur., 2008; Brownmiller i sur., 2008). Stoga, cilj ovog dijela doktorskog istraživanja bio je odrediti utjecaj primijenjenih metoda obrade kultivirane borovnice (pasterizacija, liofilizacija te tretman ultrazvukom visokog intenziteta) na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost.

5.1.1. Fenolni profil nativnih uzorka i ekstrakata borovnice

Fenolni spojevi određeni su u nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice. Za pripremu ekstrakata korištena je smjesa etanola i vode (80:20) koja se i u drugim istraživanjima pokazala najboljom za ekstrakciju fenola iz biljnih uzoraka (Luque-Rodríguez i sur., 2006). Osim toga, primjena etanola u prehrambenoj industriji prikladnija od metanola zbog manje toksičnosti i manjeg zagađenja okoliša (Khoddami i sur., 2013). Ekstrakcija organskim otapalima omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju većine prisutnih fenolnih spojeva u ispitivanim uzorcima ali ne predstavlja prirodne uvjete koji se pojavljuju tijekom transporta hrane kroz gastrointestinalni trakt. Stoga su osim ekstrakata, pripremljeni i nativni uzorci koji su korišteni u drugom djelu istraživanja za praćenje utjecaja *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu.

Kvantitativna analiza fenolnih spojeva iz uzoraka borovnice provedena je Folin-Ciocalteu metodom budući je jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje ukupnih fenola jer je jednostavna, pouzdana i ponovljiva. Poznato je da i druge ne-fenolne komponente prisutne u borovnici, kao na primjer vitamin C, mogu reducirati Folin-Ciocalteu reagens te time utjecati na točnost dobivenih rezultata (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Međutim, Cassani i sur. (2018) posebno su odredili redukcijsku aktivnost vitamina C u soku jagode te je oduzeli od vrijednosti za ukupne fenole te ustanovili da vitamin C nije značajno utjecao na određeni udio ukupnih fenola.

Rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktima i nativnim uzorcima prikazani su na Slici 11. Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti u usporedbi s nativnim uzorcima sadrže značajno veći udio fenola što samo po sebi ne predstavlja novost u ovakvom tipu istraživanja. Mnoge su studije potvrdile da su organska otapala djelotvornija za ekstrakciju fenolnih spojeva u odnosu na vodu (Correa-Betanzo, 2013; Candrawinata i sur., 2014; Sengul i sur., 2014). Na primjer, Lapornik i sur. (2005) usporedbom različitih ekstrakcijskih otapala zaključili su da etanolni i

metanolni ekstrakt crvenog i crnog ribizla sadrže dva puta više antocijana i polifenola nego vodeni ekstrakt, dok su vrijednosti ekstrakta crnog grožđa bile čak sedam puta veće u odnosu na vodeni ekstrakt. Dobiveni rezultati ukupnih fenola u netretiranom ekstraktu u skladu su s dosadašnjim istraživanjima provedenim na kultiviranim borovnicama (Neveu i sur., 2010; Dragović-Uzelac i sur., 2010). S ciljem lakše usporedbe utjecaja različitih metoda obrade na sadržaj ukupnih fenola ispitana je značajnost razlika između dobivenih rezultata (Tablica 10). Udio fenolnih spojeva u liofiliziranoj borovnici (AL) je 33% veći u odnosu na netretiranu borovnicu što je u skladu s rezultatima istraživanja Sablani i sur. (2011). Utjecaj liofilizacije na veću učinkovitost postupka ekstrakcije moguće je dovesti u vezu s formiranjem kristala leda koji uzrokuju pucanje stanične strukture i time omogućuju bolji kontakt s otapalom (Keinänen i Julkunen-Tiitto, 1996). Očekivano, pasterizacija je uzrokovala značajan pad ukupnih fenola što je prethodno potvrđeno i drugim istraživanjima (Terefe i sur., 2013; Chen i sur., 2013). Ultrazvučni tretman pokazao je bolju retenciju fenolnih spojeva u odnosu na pasterizaciju budući je sadržaj ukupnih fenola u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima veći u usporedbi s pasteriziranim uzorkom, dok je kod ukupno 6 uzoraka (A1, A3, A6, A9, A10, A11) ta razlika bila značajno veća (Tablica 9). Smatra se da osim pucanja stanične stijenke uslijed kavitacije boljoj ekstrakciji tijekom ultrazvučnog tretmana doprinosi i otplinjavanje (uklanjanje) kisika iz voćne kaše (Cheng i sur., 2014). Između netretiranog i ultrazvučno tretiranih uzoraka nije uočena statistički značajna razlika po pitanju udjela ukupnih fenola iako su uzorci s najkraćim vremenom tretiranja (3 minute) te pri amplitudama 50 i 100% (uzorci A6 i A9) sadržavali veći udio ukupnih fenola (332,64 mg i 355,87 mg) u odnosu na netretirani uzorak. Blagi pad sadržaja ukupnih fenola uočen je u uzorcima s dužim vremenom tretiranja (6 i 9 minuta). Rezultati su pokazali da niti jedan od ultrazvučnih tretmana nije imao negativan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola borovnice što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su objavili Golmohamadi i sur. (2013). Značajna razlika uočena je i između nativnih uzoraka obrađenih različitim postupcima (Tablica 9), a udio fenola u liofiliziranoj borovnici bio je čak 50% veći u odnosu na netretiranu borovnicu. Najdjelotvorniji ultrazvučni tretman među nativnim uzorcima je A7 (amplituda 75%; 6 minuta) čiji je sadržaj ukupnih fenola značajno veći u odnosu na netretirani uzorak, a najmanji udio ukupnih fenola određen je nakon tretmana A1 (amplituda 100%; 6 minuta) i A6 (amplituda 50%; 3 minute).

Osim kvantitativne analize fenola, u istraživanju je provedena i kvalitativna analiza fenolnih spojeva iz uzoraka borovnice koristeći HPLC/UV-Vis/PDA tehniku. Od fenolnih komponenti identificirani su spojevi koji pripadaju antocijanima, flavonolima te fenolnim kiselinama. U nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice identificirano je ukupno 11

antocijana. U Tablicama 10. i 11. prikazane su koncentracije pojedinačnih antocijana izražene u mg/100g borovnice. U svim nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice, neovisno o načinu obrade, najzastupljeniji antocijan je malvidin-3-galaktozid što je u sladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja (Gao i Mazza, 1994; Može i sur., 2011). Ekstrakt iz netretirane borovnice, osim malvidin-3-galaktozida, sadrži i najveću koncentraciju delfinidin-3-galaktozida, cijanidin-3-galaktozida, delfinidin-3-arabinozida, petunidin-3-galaktozida, peonidin-3-galakotozida, peonidin-3-glukozida, i malvidin-3-arabinozida te stoga sadrži i najveću količinu ukupnih antocijana (89,53 mg). Prema podacima iz Phenol-Explorer baze udio antocijana u kultiviranoj borovnici iznosi 133,99 mg/100 g (Neveu i sur., 2010), dok Howard i Hager (2007) navode da se taj udio može kretati od 20 do 269 mg/100 g svježeg ploda. Uspoređujući rezultate ukupnih antocijana u nativnim uzorcima najveća koncentracija također je određena u netretiranom uzorku borovnice (13,4 mg). Brownmiller i sur. (2008) ispitivali su utjecaj termičke obrade na proizvode od borovnice te ustanovili značajan gubitak antocijana (28 do 59%) i antioksidacijskog kapaciteta što je potvrđeno i ovim istraživanjem. U pasteriziranom nativnom uzorku i ekstraktu detektirani su samo peonidin i malvidin glikozidi, a ukupna količina antocijana reducirana je za gotovo 71% u odnosu na netretirani nativni uzorak te 80% u odnosu na netretirani ekstrakt. Koncentracija antocijana u ultrazvučno tretiranim nativnim uzorcima kretala se od od 4,95 mg (A2) do najviše 12,00 mg u uzorku s najdužim vremenom tretiranja (9 minuta) pri amplitudi 75% (uzorak A11). U ultrazvučno tretiranim ekstraktima koncentracija antocijana kretala se od 55,32 mg (A11) do najviše 68,30 mg u uzorku s najdužim vremenom tretiranja (9 minuta) pri amplitudi 50% (uzorak A3). Delfinidin-3-glukozid je jedini antocijan detektiran isključivo u ultrazvučno tretiranim ekstraktima i nativnim uzorcima.

U nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice identificirano je ukupno pet vrsta glikozida antocijana, a najzastupljeniji su u svim uzorcima malvidin glikozidi (Slika 12) što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su objavili Može i sur. (2011) te Li i sur. (2017). U Phenol Explorer bazi udio malvidin glikozida i delfinidin glikozida u kultiviranoj borovnici je podjednak (35,64% *vs.* 34,08%) (Neveu i sur., 2010), dok Cho i sur. (2004) navode da se udio delfinidin glikozida, ovisno o sorti, kreće od 27 do 40% te da se udio malvidin glikozida kreće od 22 do 33%.

Od flavonola u nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice identificirani su derivati kvercetina (Tablica 12 i 13) što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su objavili Može i sur. (2011). U nekim se istraživanjima navodi i prisutnost miricetina i kemferola (Taruscio i

sur., 2004; Neveu i sur., 2010). U nativnim uzorcima je, u odnosu na ekstrakte, detektiran veći broj derivata kvercetina (Tablica 12) ali su kao i antocijani prisutni u manjim količinama.

Najveća koncentracija derivata kvercetina nalazi se u netretiranom nativnom uzorku (10,66 mg) i netretiranom ekstraktu borovnice (13,58 mg). Pasterizacijom je njihov sadržaj reduciran za oko 50% u nativnim uzorku te za gotovo 80% u pasteriziranom ekstraktu. Značajan gubitak flavonola pri termičkoj obradi borovnice, jagode i mnogih vrsta povrća naveli su i Rothwell i sur. (2015). Koncentracija derivata kvercetina znatno je veća u odnosu na rezultate drugih istraživanja, ali je istovremeno određena i značajno manja koncentracija klorogenske kiseline u odnosu na rezultate drugih istraživanja (Neveu i sur., 2010; Rodriguez-Mateos i sur., 2011; Može i sur., 2011). Razlike u sadržaju pojedinih fenolnih spojeva u odnosu na već publicirane rezultate mogu se pripisati varijabilnosti biljnog materijala zbog mjesta uzgoja, klimatskih uvjeta, ali i zbog različitih metodologija korištenih za pripremu ekstrakta ili kvantifikaciju fenolnih spojeva. Rodriguez-Mateos i sur. (2011) navode da udio klorogenske kiseline, ovisno o sorti kultivirane borovnice, može varirati od 36,3 do 126,1 mg/100 g suhe tvari. U nativnim uzorcima su, osim klorogenske kiseline, identificirana i tri derivata hidroksicimetne kiseline, kafeinska, *p*-kumarinska kiselina te derivat hidroksibenzojeve kiseline (Tablica 14). Klorogenska kiselina detektirana je samo u netretiranom, liofiliziranom, pasteriziranom te ultrazvučno tretiranim uzorcima A4 i A11 s najdužim tretmanom (9 minuta) pri amplitudama 100% i 75% (Tablica 15). Ukupna količina svih detektiranih fenolnih kiselina u liofiliziranom nativnom uzorku dva puta je veća u odnosu na netretirani te pasterizirani nativni uzorak i u prosjeku sedam puta veća od ultrazvučno tretiranih nativnih uzoraka. Koncentracija klorogenske kiseline u liofiliziranom ekstraktu bila je u odnosu na netretirani ekstrakt veća za 25%, dok je u ultrazvučno tretiranim ekstraktima u prosjeku je reducirana za 60%.

Na Slikama 13. i 14. prikazan je udio pojedinih fenolnih skupina u nativnim uzorcima i ekstraktima borovnice. U netretiranom i svim ultrazvučno tretiranim nativnim uzorcima antocijani su najzastupljenija fenolna skupina s 43% te prosječno 57%, dok su u liofiliziranom i pasteriziranom nativnom uzorku najzastupljenije fenolne kiseline s udjelima od 40% te 45% (Slika 13). Antocijani su najzastupljeniji fenolni spojevi u svim ekstraktima i čine oko 80% svih identificiranih fenolnih pojeva (Slika 14) što je u skladu s rezultatima koje su objavili Može i sur. (2011), dok u Phenol-Explorer bazi udio antocijana određen kromatografskom tehnikom iznosi 43% (Neveu i sur., 2010).

Za bolju interpretaciju podataka dobivenih HPLC-om, s ciljem određivanja karakterističnih fenolnih spojeva za pojedini ispitivani uzorak s obzirom na korištene metode

obrade, provedena je analiza glavnih komponenti (eng. *Principal component analysis*, PCA) za nativne uzorke i ekstrakte borovnice. Kao varijable uzeti su pojedinačni antocijani, flavonol glikozidi i fenolne kiseline, a kao slučajevi nativni uzorci, odnosno ekstrakti borovnice. Karakteristični rezultati provedene PCA analize za nativne uzorke i ekstrakte grafički su prikazani kao korelacija varijabli s faktorima i koordinate faktora za uzorke preko prikaza doprinosa svakog uzorka. Prikaz preko korelacijskog kruga je veoma prikladan za izražavanje rezultata i jasno se mogu uočiti korelacijski odnosi među parametrima, zbog toga što faktorske koordinate ne mogu imati vrijednost veću od 1, pa ulaze unutar jediničnog kruga.

Grafički prikaz PCA analize obuhvaća prva dva faktora (PC1 *vs.* PC2) koja opisuju 68,83% ukupne varijabilnosti nativnih uzoraka borovnice (Slika 15). Uzorci s najvećim doprinosom PC1 faktoru su netretirani i liofilizirani uzorak a karakterizirani su prisutnošću malvidin-3-galaktozida, cijanidin-3-galaktozida i derivata kvercetina (der. 5). Pasterizirani uzorak nalazi se u suprotnom kvadrantu i pokazao je značajniju povezanost s PC2 faktorom te je karakteriziran prisutnošću derivata hidroksicimetne kiseline. Svi ultrazvučno tretirani ekstrakti grupirani su u ograničenom području što potvrđuje da između njih nema značajne razlike, a nisu niti pokazali značajan doprinos faktorima PC1 i PC2. Slični rezultati uz nešto bolju korelaciju među promatranim parametrima, dobiveni su i PCA analizom ekstrakata borovnice (Slika 16). Grafički prikaz PCA analize obuhvaća prva dva faktora koja opisuju 82,64% ukupne varijabilnosti. Utvrđena je sličnost netretiranog i liofiliziranog ekstrakta budući se nalaze u istom kvadrantu. Oba ekstrakta karakterizirana su prisutnošću delfinidin-3-galaktozida, petunidin-3-galaktozida i malvidin-3-galaktozida koji snažno koreliraju s PC1 faktorom. Pasterizirani uzorak nalazi se u suprotnom kvadrantu i pokazao je značajniju povezanost s PC2 faktorom te je karakteriziran prisutnošću peonidin-3-galaktozida. Svi ultrazvučno tretirani ekstrakti, kao i u nativnim uzorcima, grupirani su u ograničenom području što potvrđuje da između njih nema značajne razlike, a nisu niti pokazali značajan doprinos faktorima PC1 i PC2.

5.1.2. Antioksidacijska aktivnost nativnih uzoraka i ekstrakata borovnice

Pri određivanju antioksidacijske aktivnosti nekog spoja ili smjese spojeva preporuča se koristiti više antioksidacijskih metoda koje se temelje na različitim mehanizmima u cilju što boljeg i preciznijeg određivanja antioksidacijskog kapaciteta ispitanog uzorka. S obzirom na sposobnost neutralizacije slobodnog radikala, razvijene su metode koje se temelje na prijenosu protona (HAT metode, eng. *Hydrogen Atom Transfer*,), prijenosu elektrona (SET metode, eng. *Single Electron Transfer*,) i kombinirane metode koje se temelje na prijenosu protona i elektrona (Bursać-Kovačević, 2010). Za potrebe ovog istraživanja antioksidacijski kapacitet ekstrakata i nativnih uzoraka borovnice određen je FRAP metodom koja se temelji na prijenosu elektrona i kombiniranom DPPH metodom za koju se smatra da se bazira na prijenosu elektrona, dok se prijenos protona zbiva kao popratna reakcija. Budući da dodatak antioksidansa u lipidni medij može usporiti proces autooksidacije dodatno je ispitan i utjecaj ekstrakata borovnice na produženje oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja Rancimat metodom.

Učinkovitost „gašenja“ molekula slobodnih radikala određena je DPPH metodom, a rezultati su prikazani na Slici 17. Iz rezultata je vidljivo da učinkovitost ekstrakata u inhibiciji DPPH radikala iznosi u prosjeku 53%, a nativnih uzoraka svega 10%. U Tablici 15. prikazani su rezultati testiranja značajnosti razlika između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i nativnih uzoraka, dobivene obzirom na metode obrade borovnice, iz kojih se može uočiti postojanje statistički značajne razlike (ekstrakti: $p=0,031$; nativni uzorci: $p=0,001$). Veći sadržaj ukupnih fenola omogućio je i veću učinkovitost u gašenju slobodnih radikala stoga je među ekstraktima i nativnim uzorcima najučinkovitiji bio liofilizirani uzorak (72,35% *vs.* 24,27% inhibicije). Osim povećanja ekstrakcije ukupnih fenola, i druga istraživanja potvrdila su da se liofilizacijom utječe i na povećanje antioksidacijskog kapaciteta (Mejía-Meza i sur., 2008; Orphanides i sur., 2013). Hwang i sur. (2014) analizirali su antioksidacijski kapacitet kultivirane borovnice te ustanovili da pri koncentraciji od 0,5 g/L učinkovitost inhibicije DPPH radikala iznosi 40,6%. Mnoga istraživanja ispitivala su i antioksidacijski kapacitet soka kultivirane borovnice te ustanovila da je inhibitorni kapacitet DPPH radikala iznosio 69,4%/100 mL soka (Rossi i sur., 2003), odnosno 8,5%/mL soka (Slatnar i sur., 2012). Wang (2007) navodi da je klorogenska kiselina najzastupljenija fenolna kiselina u kultiviranim borovnicama, a vrlo često i najzastupljeniji pojedinačni fenolni spoj, koja se smatra i jednim od najaktivnijih antioksidansa u borovnici. Kultivirana borovnica korištena u ovom istraživanju sadržavala je značajno manji udio klorogenske kiseline u odnosu na rezultate

drugih istraživanja, što može biti razlog i izmjerene manje antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi. Najslabije inhibicijsko djelovanje među ekstraktima borovnice pokazali su uzorci A10 (amplituda 75%; 6 minuta) i pasterizirani ekstrakt (47,69% *vs.* 47,39% inhibicije). Nadalje, nativni pasterizirani uzorak pokazao je veće inhibicijsko djelovanje od netretiranog i svih ultrazvučno tretiranih nativnih uzoraka. Povećanje antioksidacijskog kapaciteta uslijed termičke obrade moguće je zbog formiranja melanoidnih spojeva kao produkata Maillardovih reakcija koji iskazuju određenu antioksidacijsku aktivnost (Yilmaz i Toledo, 2005) ili uslijed formiranja polimera antocijana (Brownmiller i sur., 2008). Aadil i sur. (2013) i Mohideen i sur. (2015a) primjenom DPPH metode pokazali su da se antioksidacijski kapacitet nakon tretmana ultrazvukom značajno povećao u usporedbi s netretiranim uzorkom. Iako su gotovo svi ultrazvučno tretirani ekstrakti pokazali veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na netretirani ekstrakt, statističkom analizom je značajno povećanje utvrđeno samo kod ekstrakta A8 (amplituda 75%; 3 minute) (Tablica 15). Isto tako i u većini ultrazvučno tretiranih nativnih uzoraka utvrđena je veća antioksidacijska aktivnost, a značajno povećanje utvrđeno je u svim uzorcima tretiranim 9 minuta (A3, A4 i A11) te u uzorcima A7 i A10 (amplituda 75%; 6 minuta) (Tablica 15.).

Rezultati određivanja redukcijske snage korištenjem FRAP metode, prikazani su na Slici 18. Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između ekstrakata i nativnih uzoraka borovnice određene ovom metodom bile su još izraženije u usporedbi s DPPH metodom budući je redukcijska snaga ekstrakata bila u prosjeku 15 puta veća u odnosu na nativne uzorke borovnice. U Tablici 16. prikazani su rezultati testiranja značajnosti razlika između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i nativnih uzoraka, dobivenih različitim metodama obrade borovnice, iz kojih se može uočiti postojanje statistički značajne razlike između uzoraka. Najbolju redukcijsku snagu, kao i u rezultatima DPPH metode, pokazali su liofilizirani ekstrakt (2,31 mmol Fe^{2+}/100 g) i liofilizirani nativni uzorak (0,27 mmol Fe^{2+}/100 g). Najslabiju redukcijsku snagu među ekstraktima pokazali su uzorci A5 (amplituda 75%; 6 minuta) (1,30 mmol Fe^{2+}/100 g) i pasterizirani ekstrakt (1,35 mmol Fe^{2+}/100 g), a nativni pasterizirani uzorak je, isto kao i u rezultatima DPPH metode, pokazao veću redukcijsku snagu od netretiranog i svih ultrazvučno tretiranih nativnih uzoraka. Dobiveni rezultati u skladu su s objavljenim rezultatima istraživanja Kraujalyte i sur. (2015) prema kojima je antioksidacijska aktivnost soka borovnice, ovisno o sorti, iznosila 0,49 – 1,15 mmol Fe^{2+}/100 g soka. Remberg i sur. (2007) ispitivali su antioksidacijsku aktivnost 17 različitih sorti kultiviranih borovnica te se izmjerena antioksidacijska aktivnost kretala u rasponu od 2,78 – 5,06 mmol Fe^{2+}/100 g borovnica.

Brojnim istraživanjima potvrđeno je da borovnice imaju snažnu antioksidacijsku aktivnost *in vitro* koja je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem fenolnih spojeva (Wang i sur., 2008; Giovanelli i Buratti, 2009; Dragović-Uzelac i sur., 2010; Li i sur., 2017). U ovom radu istraženi su koeficijenti korelacije ukupnih fenola, antocijana, flavonola i fenolnih kiselina s antioksidacijskim kapacitetom (DPPH i FRAP) nativnih uzoraka i ekstrakata, a rezultati su prikazani u Tablicama 17. i 18. Utvrđena je statistički značajna, srednje jaka korelacija između sadržaja ukupnih fenola i obje antioksidacijske metode (r=0,732-0,859). Iako su mnoga istraživanja potvrdila dobru korelaciju između antocijana i antioksidacijskog kapaciteta (Moyer i sur., 2002; Li i sur., 2017), ovim istraživanjem to je potvrđeno samo u ekstraktima i to za FRAP metodu. Naime, samo udio antocijana u ekstraktima borovnice je pokazao srednje jaku korelaciju s FRAP metodom (r=0,626; p=0,017). Visoki koeficijent korelacije utvrđen je između FRAP metode i udjela fenolnih kiselina u nativnim uzorcima (r=0,904; p<0,001), što su u svom istraživanju potvrdili i Moreira i sur. (2005), dok je u ekstraktima korelacija bila nešto slabija (r=0,583; p=0,028).

Može se zaključiti da FRAP metoda bolje korelira s pojedinim testiranim fenolnim skupinama dok je korelacija između ukupnih fenola i antioksidacijskih metoda podjednaka u nativnim uzorcima i ekstraktima. Autori koji su proveli usporedbu najčešće korištenih antioksidacijskih metoda zaključuju da se FRAP metoda smatra boljim odabirom za procjenu antioksidacijske aktivnosti zbog jednostavnosti, visoke reproducibilnosti i korelacije sa sadržajem fenola (Thaipong i sur., 2006; Moharram i Youssef, 2014).

Treća metoda kojom je testiran antioksidacijski kapacitet ekstrakata borovnice je Rancimat metoda kojom je određen utjecaj ekstrakata na produženje oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja. Biljna ulja, posebice nerafinirana, podložna su oksidacijskim i hidrolitičkim promjenama što dovodi do promjene organoleptičkih svojstava i smanjenja njihove prehrambene vrijednosti. Mnoga istraživanja pokazala su da se dodatkom antioksidansa može povećati oksidacijska stabilnost ulja i time produžiti rok trajanja namirnicama koje sadrže lipide (Yanishlieva i Marinova, 2001; Bouaziz i sur., 2010; Aladedunye i sur., 2014a; Taha i sur., 2014). Istraživanja su uglavnom provedena korištenjem ekstrakata raznih začinskih biljaka, a mali je broj istraživanja ispitivao utjecaj ekstrakata voća (Aladedunye i sur., 2014b; Asnaashari i sur., 2015) na oksidacijsku stabilnost namirnica koje sadrže lipide. Ekstra djevičansko maslinovo ulje (EDMU) odabrano je kao testni medij budući da se smatra jednim od nutritivno najvrjednijih ulja korištenih u prehrani. Rezultati utjecaja ekstrakata borovnice na produženje oksidacijske stabilnosti EDMU prikazani su u Tablici 19. Najveće produljenje oksidacijske stabilnosti EDMU, izraženo kroz indukcijsko vrijeme u satima, postignuto je

dodatkom ultrazvučno tretiranih ekstrakata A2 (amplituda 50%; 6 minuta) i A4 (amplituda 100%; 9 minuta). Unatoč značajnom smanjenju udjela fenolnih spojeva uslijed termičke obrade, pasterizirani ekstrakt borovnice je i ovom metodom pokazao dobar antioksidacijski potencijal. Iako su mnoga istraživanja (Huang i sur., 2005; Dragović-Uzelac i sur., 2010; Moharram i Youssef, 2014) potvrdila korelaciju između udjela fenola i antioksidacijske aktivnosti, Tiveron i sur. (2012) te Kulišić-Bilušić i sur. (2008) navode da produljenje oksidacijske stabilnosti ulja ne korelira s udjelom fenolnih spojeva u ekstraktima, što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Budući da mnogi ekstrakti borovnice nisu pokazali značajan utjecaj na oksidacijsku stabilnost EDMU, dodatno je ispitan učinak postupka inkapsulacije ekstrakata borovnice u mikroemulzije i liposome na produljenje oksidacijske stabilnosti ulja (rezultati su opisani u poglavlju *5.4. Utjecaj inkapsulacije na antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva borovnice).*

5.2. Utjecaj metoda obrade na aktivnost enzima polifenol oksidaze iz borovnice

Inaktivacija enzima polifenol oksidaze poželjna je budući su istraživanja pokazala da upravo ovaj enzim ima dominantu ulogu u enzimskom posmeđivanju borovnice (Kader i sur., 1997). Njegovim oslobađanjem prilikom proizvodnje voćnih prerađevina osim narušavanja organoleptičkih svojstava, dolazi i do smanjenja nutritivne vrijednosti proizvoda zbog degradacije fenolnih spojeva. Stoga je, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio ispitati učinak primijenjenih metoda obrade kultivirane borovnice na aktivnost enzima polifenol oksidaze.

Za potrebe ovog dijela istraživanja primijenjen je samo jedan ultrazvučni tretman (A9) s najvećom amplitudom (100%) i najkraćim vremenom tretiranja (3 minute) budući je u tom uzorku određen najveći udio ukupnih fenola u odnosu na ostale ultrazvučne tretmane. Rezultati prikazani na Slici 19. pokazuju da su sve ispitane metode smanjile aktivnost enzima polifenol oksidaze, a najdjelotvorniji učinak imala je liofilizacija kojom je aktivnost enzima smanjena za 93%. Istraživanja su pokazala da sušenje može gotovo u potpunosti inaktivirati enzim polifenol oksidazu (Tan i sur., 2015). Upravo radi inaktivacije polifenol oksidaze smatra se da suho začinsko bilje može sadržavati veći udio bioaktivnih komponenti u odnosu na svježi biljni materijal (Lim i Murtijaya, 2007). Manja antioksidacijska aktivnost i udio ukupnih fenola u netretiranoj kultiviranoj borovnici, u odnosu na liofiliziranu borovnicu, određena je vjerojatno i zbog aktivnosti enzima polifenol oksidaze. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja liofilizacijom se aktivnost polifenol oksidaze u đumbiru smanjila za 55% (Ghasemzadeh i sur., 2016), a u ljusci kakaa za 52% (Valadez-Carmona i sur., 2017). Opsežno istraživanje o utjecaju temperature na aktivnost enzima polifenol oksidaze u kultiviranoj borovnici proveli su Siddiq i Dolan (2017) te pokazali da je enzim vrlo aktivan u širokom temperaturnom rasponu (20-60 °C) te da je nakon tretmana na 75 °C/5 minuta preostala aktivnost enzima iznosila oko 20%. Aktivnost enzima nakon provedene pasterizacije u ovom istraživanju pri 80 °C/5 minuta iznosila je 42%. Iako su mnoga istraživanja potvrdila da je polifenol oksidaza termolabilna, Terefe i sur. (2010) ustanovili su da neke sorte jagoda sadrže termostabilnu polifenol oksidazu čija se aktivnost nakon 30 minuta pri 100 °C smanjila za svega 28%. Terefe i sur. (2015) ispitivali su utjecaj temperature i vremena tretiranja na aktivnost pročišćene polifenol oksidaze kultivirane borovnice te ustanovili da je pri temperaturama od 60 °C do 76 °C došlo do povećanja aktivnosti enzima uslijed aktivacije latentne polifenol oksidaze koja pri povišenim temperaturama mijenja svoju strukturu i prelazi u aktivan oblik. Ultrazvuk visokog intenziteta imao je najslabiji učinak na inaktivaciju enzima polifenol oksidaze pri čemu je aktivnost enzima smanjena za 43%. Dobiveni rezultati u skladu su s već objavljenim rezultatima

istraživanja koji su provedeni na kultiviranoj borovnici (Medina-Meza i sur., 2016) i soku od jabuke (Başlar i Ertugay, 2013). Ipak, primijenjeni uvjeti tretiranja ultrazvukom, kao što su amplituda, vrijeme tretiranja i intenzitet, ključni su za usporedbu rezultata s drugim istraživanjima, a niti jedno do sada objavljeno istraživanje nije koristilo potpuno iste uvjete tretiranja za praćenje inaktivacije polifenol oksidaze u kultiviranoj borovnici. Başlar i Ertugay (2013), navode da kavitacija uzrokovana brzim lokaliziranim promjenama u tlaku i temperaturi, najviše doprinosi inaktivaciji polifenol oksidaze. Budući da tijekom primjene ultrazvuka uslijed nastale kavitacije dolazi do porasta temperature tretiranog medija, Cao i sur. (2018) su uz primjenu hlađenja tijekom tretmana pratili odvojeni učinak kavitacije i temperature te su ustanovili značajno nižu inaktivaciju enzima uz primjenu hlađenja čime je potvrđeno sinergijsko negativno djelovanje kavitacije i nastale topline na inaktivaciju enzima. O'Donnell i sur. (2010) smatraju da se ultrazvukom povećava osjetljivost aktivnih centara enzima na povišenu temperaturu te da se time postiže sinergijski učinak.

5.3. Utjecaj metoda obrade na *in vitro* gastrointestinalnu stabilnost i biološke aktivnost fenolnih spojeva borovnice

Cilj ovog dijela istraživanja bio je reproducirati fiziološke uvjete u kojima se fenolni spojevi nalaze pri prolasku kroz gastrointestinalni trakt te odrediti njihov stupanj stabilnosti i biološke aktivnosti s obzirom na primijenjene metode obrade borovnice. *In vitro* probava provedena je u dvije faze, u želucu i u tankom crijevu uz primjenu humanih probavnih enzima. Za potrebe ovog dijela istraživanja kao inicijalni uzorci za praćenje utjecaja *in vitro* probave korišteni su nativni uzorci i to iz dva temeljna razloga: a) organska otapala koja se uglavnom koriste za postupak ekstrakcije ne predstavljaju prirodne uvjete pri prolasku hrane kroz probavni sustav pri čemu se fenolni spojevi podvrgavaju nizu fizičkih i kemijskih promjena te se otpuštaju iz matriksa hrane (Gil-Izquierdo i sur., 2002), b) primjena organskih otapala poput etanola, metanola i sličnih može imati izraženo inhibitorno djelovanje na probavne enzime (Saborowski i sur., 2004).

Procjena stabilnosti fenolnih spojeva važna je budući da utječe na njihovu biodostupnost, bioraspoloživost, ali i na moguće blagotvorne učinke na tkivo crijevnog epitela kao što su smanjenje oksidacijskog stresa te prevencija kancerogenih promjena (Rios i sur., 2002; Bermúdez-Soto i sur., 2007). Stoga je, osim fenolnog profila nakon provedene *in vitro* probave određena antioksidacijska i antiproliferacijska aktivnost probavljenih uzoraka borovnice.

5.3.1. Fenolni profil uzoraka nakon *in vitro* probave

Sadržaj ukupnih fenola te identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu određeni su spektrofotometrijskom i koromatografskom metodom. Stabilnost fenolnih spojeva određena je omjerom između njihove koncentracije prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu.

Rezultati određivanja ukupnih fenola nakon *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu prikazani su na Slici 20. Iz rezultata je vidljivo da je stabilnost fenola nakon provedene *in vitro* probave u želucu visoka budući je u svim uzorcima određen veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na nativni uzorak. Visoka stabilnost fenolnih spojeva borovnice u kiselim želučanim uvjetima potvrđena je i u dosadašnjim rezultatima *in vitro* istraživanja (Correa-Betanzo i sur.,

2014; Jiao i sur. 2018). U Tablici 20. prikazan je postotak povećanja ili smanjenja udjela fenola nakon provedene *in vitro* probave. Nakon provedene *in vitro* probave u želucu najveći udio fenola određen je u liofiliziranom uzorku u kojem je došlo i do najvećeg porasta udjela fenola ($p=0,001$) u odnosu na nativni uzorak. Osim toga, značajno povećanje udjela fenola detektirano je i u netretiranom uzorku borovnice te kod ukupno 6 ultrazvučno tretiranih uzoraka (A4, A5, A6, A8, A9, A10). Udio fenola u pasteriziranom uzorku porastao je za svega 1,27%. Testiranje značajnosti razlika između uzoraka nakon provedene *in vitro* probave u želucu (Tablica 21.) potvrdilo je statistički značajnu razliku između uzoraka ($p<0,001$), a udio fenolnih spojeva u liofiliziranoj borovnici bio je 2,58 puta je veći u odnosu na netretiranu borovnicu. U pasteriziranom uzorku određen je najmanji udio fenolnih spojeva dok su svi ultrazvučni tretmani pokazali bolju retenciju fenolnih spojeva u odnosu na pasterizaciju budući je sadržaj ukupnih fenola u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima veći u usporedbi s pasteriziranim uzorkom, a kod ukupno 9 tretmana (uzorci A3-A11) razlika je bila značajno veća (Tablica 21.). Zanimljivo je i da je u nekoliko ultrazvučno tretiranih nativnih uzoraka (A1, A2, A6, A8 i A9) udio ukupnih fenola bio manji u odnosu na pasterizirani uzorak, a nakon provedene *in vitro* probave u želucu udio fenola u svim spomenutim ultrazvučno tretiranim uzorcima povećao se u odnosu na pasterizirani uzorak, a za uzorke A6, A8 i A9 s najkraćim vremenom tretiranja (3 minute) utvrđen je značajno veći udio ukupnih fenola. Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da je od inicijalnog udjela fenola važnija struktura matriksa hrane i njena modifikacija koja utječe na oslobađanje fenolnih spojeva tijekom *in vitro* probave (Bohn i sur., 2015).

Nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu uočena je manja stabilnost fenolnih spojeva u odnosu na rezultate dobivene nakon *in vitro* probave u želucu što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima provedenim na aroniji (Bermúdez-Soto i sur., 2007; Tarko i sur. 2009) i borovnici (Correa-Betanzo i sur., 2014). Najslabiju stabilnost nakon provedene crijevne faze pokazao je netretirani uzorak budući je jedino u tom uzorku izmjeren značajno manji udio ukupnih fenola u odnosu na nativni uzorak ($p=0,005$) što upućuje na činjenicu da su dominantni fenoli detektirani u netretiranom nativnom uzorku nestabilni u simuliranim uvjetima probave u tankom crijevu (Tablica 20.). Najveći porast udjela fenola u odnosu na nativni uzorak ponovo je izmjeren za liofilizirani uzorak ($p=0,019$). Iako je kod većine uzoraka došlo do porasta udjela fenola nakon *in vitro* probave u tankom crijevu, uz liofilizirani uzorak samo za tri ultrazvučno tretirana uzorka (A1, A3 i A10) s dužim vremenima tretiranja (6 i 9 minuta) povećanje je bilo statistički značajno. Zanimljive rezultate istraživanja objavili su Cassani i sur. (2018) ispitujući stabilnost fenolnih spojeva soka od jagode tijekom *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu, nakon tretmana ultrazvukom. *In vitro* probava u želucu dovela je do smanjenja udjela fenola u

usporedbi s netretiranim uzorcima, međutim, nakon *in vitro* probave u tankom crijevu udio fenola u tretiranim uzorcima porastao je za 3 do 5% dok se u netretiranim udio smanjio za 14%. Bohn i sur. (2015) navode da se dio fenola kovalentno vezanih za škrob, ne mogu ekstrahirati organskim otapalima ali se mogu osloboditi tijekom probave u tankom crijevu. Testiranje značajnosti razlika između uzoraka nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu (Tablica 21.) potvrdilo je statistički značajnu razliku između uzoraka ($p<0,001$). Najveći udio fenola utvrđen je u liofiliziranom i ultrazvučno tretiranom uzorku A3 (amplituda 50%; 9 minuta) čiji su udjeli ukupnih fenola bili 4,5 puta te 2,9 puta veći u odnosu na netretirani uzorak.

Kao i u prvom djelu istraživanja, osim kvantitativne analize fenola, nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu provedena je i kvalitativna analiza fenolnih spojeva. U Tablicama 22. do 35. prikazani su rezultati pojedinačno identificiranih fenolnih spojeva prije i nakon *in vitro* dvofaznog modela probave izraženi u mg/100 g borovnice, a na Slikama 21. do 23. grafički je prikazan zbroj pojedinačno identificiranih antocijana, flavonol glikozida i fenolnih kiselina u uzorcima netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice.

Nakon provedene *in vitro* probave u želucu uočena je visoka stabilnost antocijana i njihovo otpuštanje iz matriksa hrane budući je koncentracija antocijana u svim uzorcima porasla u prosjeku 3,94 puta. Najveći porast ukupnih antocijana u odnosu na nativni uzorak određen je u liofiliziranom uzorku (10 puta), dok je među ultrazvučno tretiranim uzorcima najveći porast uočen kod uzorka A9 s najkraćim vremenom tretiranja i najvećom amplitudom (6,3 puta). U pasteriziranom uzorku gotovo da nije bilo promjene u koncentraciji ukupnih antocijana nakon provedene *in vitro* probave u želucu. I dosadašnja istraživanja provedena na borovnici (Correa-Betanzo i sur., 2014; Jiao i sur. 2018) i drugom voću i povrću bogatom antocijanima, kao što su aronija (Bermúdez-Soto i sur., 2007), crveno grožđe (Tagliazucchi i sur., 2010) i nar (Fawole i Opara, 2016) te ljubičasti kupus (McDougall i sur., 2007; Podsedek i sur., 2014), potvrdila su visoku stabilnost antocijana u niskim pH uvjetima želuca budući se pri niskom pH formira crveno obojani flavilium kation koji predstavlja najstabilniji oblik antocijana (Bermúdez-Soto i sur., 2007). U netretiranom, liofiliziranom i svim ultrazvučno tretiranim uzorcima nakon *in vitro* probave u želucu detektirani su glikozidi delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina, a u pasteriziranom uzorku određeni su samo peonidin i malvidin glikozidi, kao i u inicijalnom nativnom uzorku. U svim uzorcima nakon provedene *in vitro* probave u želucu, neovisno o načinu obrade, najzastupljeniji antocijan je malvidin-3-galaktozid. Peixoto i sur. (2018) u svom istraživanju također su potvrdili da su

malvidin derivati borovnice najstabilniji glikozidi nakon provedene *in vitro* probave. Najveće povećanje malvidin-3- galaktozida nakon *in vitro* probave u želucu u odnosu na nativni uzorak određeno je u liofiliziranom uzorku (6,7 puta), dok je među ultrazvučno tretiranim uzorcima najveće povećanje određeno u uzorku A9 (amplituda 100%; 3 minuta) (4,6 puta).

Nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu gubitak antocijana u gotovo svim uzorcima bio je potpun. Jedini uzorak u kojem je detektirano svega 0,58 mg malvidin-3-galaktozida bio je ultrazvučno tretirani uzorak A4. U dosadašnjim istraživanjima provedenim na borovnici (Correa-Betanzo i sur., 2014; Jiao i sur. 2018), crvenom grožđu (Tagliazucchi i sur. 2010) i naru (Pérez-Vicente i sur. 2002) gubitak antocijana nakon *in vitro* probave u takom crijevu iznosio je 80-97%, dok su Ariza i sur. (2017) zabilježili potpuni gubitak antocijana jagode. Gubitak antocijana u lužnatoj sredini tankog crijeva može se objasniti njihovom djelomičnom transformacijom u bezbojne halkone pri pH 6 te njihovom degradacijom pri pH vrijednostima većim od 7 (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Upravo radi njihove nestabilnosti u lužnatim uvjetima tankog crijeva upitna je i njihova biološka aktivnost u *in vivo* uvjetima ali neki autori sugeriraju i mogućnost njihove apsorpcije direktno iz želuca (Bouayed i sur. 2011). Zanimljivo istraživanje proveli su Czank i sur. (2013) kojim su i dokazali da je bioraspoloživost antocijana podcijenjena. Ispitanici su konzumirali izotopno obilježen cijanidin-3-glukozid, a koncentracija metabolita je određena u krvi, urinu, izdahu i stolici. Rezultati su pokazali puno veću raznolikost cirkulirajućih metabolita kao i značajno veću bioraspoloživost (oko 12%) nego što su studije provedene do tada pokazale. McDougall i sur. (2007) uspoređivali su utjecaj *in vitro* probave na stabilnost ukupnih fenola i antocijana ljubičastog kupusa. Nakon provedene simulirane probave koncentracija detektiranih ukupnih fenola bila je oko 70% veća u odnosu na ukupne antocijane te su autori zaključili da ukupni fenoli detektirani nakon probave uključuju i produkte degradacije, odnosno konverzije antocijana u druge neidentificirane metabolite koji su zaslužni za biološke aktivnosti koje se pripisuju antocijanima.

Iz skupine flavonol glikozida identificirani su derivati kvercetina koji su također pokazali dobru stabilnost u kiselim želučanim uvjetima. Najveća koncentracija ukupnih flavonol glikozida određena je u liofiliziranom uzorku (25,36 mg) u kojem je došlo i do najvećeg porasta u odnosu na nativni uzorak (2,63 puta). Samo u pasteriziranom i ultrazvučno tretiranom uzorku A10 (amplituda 75%; 6 minuta) koncentracija flavonol glikozida se nakon provedene *in vitro* probave u želucu smanjila. Visoka stabilnost kvercetina u uvjetima *in vitro* probave u želucu zabilježena je i u drugim studijama provedenim na borovnici (Correa-Betanzo i sur., 2014; Jiao i sur. 2018), aroniji (Bermúdez-Soto i sur., 2007) i crvenom grožđu (Tagliazucchi i sur. 2010). U istraživanju Jiao i sur. (2018) identificirano je 6 glikozida

kvercetina od kojih su koncentracije dva glikozida (kvercetin glukuronida i kvercetin-3-rutinozida) porasle su za oko 50%, a koncentracije ostalih su bile nepromijenjene. Nakon provedene *in vitro* probave u želucu identificirani su isti derivati kvercetina kao i u nativnim uzorcima, dok su u uzorcima nakon *in vitro* probave u tankom crijevu identificirani novi derivati kvercetina što upućuje na strukturne promjene flavonola tijekom *in vitro* probave. Gubitak derivata kvercetina iz borovnice nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu potvrđen je i u drugim studijama (Correa-Betanzo i sur., 2014; Jiao i sur. 2018). Prosječni gubitak flavonol glikozida nakon *in vitro* probave u tankom crijevu iznosio je oko 60%, a najveći gubitak zabilježen je u netretiranom uzorku (92%).

Iz skupine fenolnih kiselina identificirani su derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te klorogenska, kafeinska i kumarinska kiselina koje su također pokazale dobru stabilnost u kiselim želučanim uvjetima. U svim uzorcima, osim pasteriziranog i ultrazvučno tretiranog uzorka A10 (amplituda 75%; 6 minuta), došlo je do porasta koncentracije fenolnih kiselina, dok je u ultrazvučno tretiranom uzorku A6 (amplituda 50%; 3 minute) koncentracija fenolnih kiselina ostala nepromijenjen. U nativnim uzorcima te nakon *in vitro* probave u želucu dominantna fenolna kiselina u netretiranom, liofiliziranom i pasteriziranom uzorku bila je klorogenska kiselina, dok je u ultrazvučno tretiranim uzorcima bila prisutna u vrlo malim količinama ili nije niti detektirana. Dosadašnja istraživanja provedena na borovnici dala su kontradiktorne rezultate o stabilnosti klorogenske kiseline tijekom *in vitro* probave. U istraživanju koje su proveli Correa-Betanzo i sur. (2014) udio klorogenske kiseline bio je stabilan tijekom *in vitro* probave u želucu, ali i u tankom crijevu, dok su Jiao i sur. (2018) ustanovili gubitak od 35% nakon *in vitro* probave u želucu te potpuni gubitak nakon *in vitro* probave u tankom crijevu. Bouayed i sur. (2012) pratili su stabilnost klorogenske kiseline iz nekoliko vrsta jabuka tijekom *in vitro* probave. Nakon probave u želucu stabilnost klorogenske kiseline bila je visoka te je njen udio iznosio 83-109% u odnosu na početnu koncentraciju, dok je nakon probave u tankom crijevu degradirano 41-77% klorogenske kiseline. U ovom istraživanju, nakon *in vitro* probave u tankom crijevu, došlo je do smanjenja koncentracije klorogenske kiseline u liofiliziranom i pasteriziranom uzorku, a u netretiranom uzorku gubitak je bio potpun. Jedini uzorak u kojem je određeno povećanje koncentracije klorogenske kiseline bio je ultrazvučno tretirani uzorak A4 (amplituda 100%; 9 minuta). Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu smanjila se u liofiliziranom i pasteriziranom uzorku, u netretiranom uzorku ostala je gotovo nepromijenjena dok je u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima došlo do njihovog porasta. U netretiranom i u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima nakon *in vitro* probave u

tankom crijevu detektiran je derivat hidroksibenzojeve kiseline u značajnom udjelu zbog čega je došlo i do porasta ukupnih fenolnih kiselina. Razlozi mogućeg povećanja udjela fenolnih kiselina nakon probave u tankom crijevu su dodatno otpuštanje iz matriksa hrane ili transformacija degradiranih antocijana u fenolne kiseline (Fleschhut i sur., 2006).

S ciljem određivanja utjecaja primijenjenih metoda obrade i *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu na sadržaj ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina (antocijani, flavonol glikozidi i fenolne kiseline) provedena je analiza varijance. Dobiveni rezultati pokazuju da oba promatrana čimbenika značajno utječu na sadržaj ukupnih fenola i fenolnih kiselina ($p<0,05$), dok samo *in vitro* probava značajno utječe na sadržaj antocijana i flavonol glikozida ($p<0,001$).

S ciljem određivanja karakterističnih fenolnih spojeva za pojedini ispitivani uzorak s obzirom na korištene metode obrade, nakon provedene *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu, provedena je PCA analiza a rezultati su prikazani na Slikama 24. i 25. Kao varijable uzeti su pojedinačni antocijani, flavonol glikozidi i fenolne kiseline, a kao slučajevi uzorci nakon in vitro probave u želucu, odnosno tankom crijevu. Grafički prikaz PCA analize nakon provedene *in vitro* probave u želucu obuhvaća prva dva faktora koji opisuju 72,87% ukupne varijabilnosti. Gotovo svi fenolni spojevi, izuzev derivata hidroksicimetne kiseline nalaze se na lijevoj, negativnoj strani PC1, a najviše se izdvaja liofilizirani uzorak kojeg karakteriziraju antocijani (delfinidin-3-galaktozid, petunidin-3-galaktozid, malvidin-3-galaktozid i cijanidin-3-galaktozid). Pasterizirani uzorak nalazi se u suprotnom kvadrantu i pokazao je značajniju povezanost s PC2 faktorom te je karakteriziran prisutnošću derivata hidroksicimetne kiseline (der. 3). Grafički prikaz PCA analize nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu obuhvaća prva dva faktora koji opisuju 64,21% ukupne varijabilnosti. Pasterizirani uzorak pokazuje najviši doprinos PC1 faktoru te ga podjednako karakterizira prisutnost kvercetin-3-glukozida, derivati kvercetina (der. 3 i 4) te derivat hidroksicimetne kiseline (der. 3). Liofilizirani uzorak pokazao je najznačajniju povezanost s PC2 faktorom te je karakteriziran prisutnošću derivata kvercetina (der. 7 i 8). Doprinos PC2 faktoru pokazao je i ultrazvučno tretirani uzorak A4 (amplituda 100%; 9 minuta) koji je karakteriziran prisutnošću malvidin-3-galaktozida i klorogenske kiseline.

Usporedbom dobivenih rezultata netretirane, liofilizirane, pasterizirane i ultrazvučno tretirane borovnice možemo primijetiti razlike u stabilnosti fenola što podrazumijeva da je prethodnim tretmanima obrade borovnice došlo do modifikacije matriksa hrane. Najbolju stabilnost svih određenih skupina fenolnih spojeva nakon *in vitro* probave u želucu pokazao je liofilizirani uzorak, a dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima jedine slične studije koja je

pratila stabilnost fenola tijekom *in vitro* probave iz svježe i liofilizirane jabuke (Dalmau i sur., 2017). Koncentracije ukupnih fenola ali i antioksidacijska aktivnost nakon *in vitro* probave bila je manja u odnosu na svježi uzorak, međutim treba napomenuti da je i prije *in vitro* probave u liofiliziranoj jabuci određen manji udio fenolnih spojeva u odnosu na svježu što nije bio slučaj u ovom istraživanju. Međutim, u nedavno objavljenom istraživanju Bilušić i sur. (2019) praćena je gastrointestinalna stabilnost karotenoida iz svježeg i liofiliziranog povrća uz primjenu humanih enzima te je ustanovljen snažan učinak liofilizacije na poboljšanje gastrointestinalne stabilnosti ispitivanih karotenoida.

Nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu najveća koncentracija flavonol glikozida određena je u liofiliziranom uzorku, dok su najveće koncentracije antocijana i fenolnih kiselina određene u ultrazvučno tretiranom uzorku A4 s najvećom amplitudom (100%) i najdužim vremenom tretiranja (9 minuta). Terefe i sur. (2016) potvrdili su da kao posljedica kavitacije nastale prilikom tretmana ultrazvukom, dolazi do modifikacije matriksa hrane što može biti razlog veće stabilnosti fenola tijekom *in vitro* probave.

Matriks hrane vrlo je važan čimbenik stabilnosti, ali i probavljivosti fenolnih spojeva (Sensoy, 2014). Siracusa i sur. (2011) pratili su stabilnost klorogenske kiseline u dva različita matriksa (kapari i motar) te su uočili značajne razlike u njihovoj stabilnosti. Slično istraživanje proveli su Poljuha i sur. (2015) uz korištenje humanih probavnih sokova te zaključili da su flavonol glikozidi bljušta imali veću stabilnost nakon provedene *in vitro* probave u odnosu na bodljikavu veprinu i divlju šparugu. Stabilnost antocijana iz crvenog kupusa i ekstrakta kupusa pratili su Podsedek i sur. (2014) te potvrdili snažan utjecaj matriksa hrane na stabilnost antocijana tijekom *in vitro* probave. Zaključili su da komponente crvenog kupusa povećavaju stabilnost antocijana tijekom probave budući je veći udio antocijana nakon *in vitro* probave određen u probavljenom uzorku kupusa u odnosu na ekstrakt kupusa. Usporedbom stabilnosti individualne, komercijalne klorogenske kiseline i one iz aronije tijekom *in vitro* probave uočen je gubitak od 5% komercijalne klorogenske kiseline, dok se udio klorogenske kiseline određen nakon probave aronije povećao za gotovo 24% (Bermúdez-Soto i sur., 2007).

Većina istraživanja spomenuta u raspravi koja su se odnosila na ispitivanje stabilnosti fenolnih spojeva tijekom *in vitro* probave provela su se uz korištenje komercijalnih enzima životinjskog podrijetla. Iz tog razloga kao jedan od uzroka manje stabilnosti određenih spojeva u ovom doktorskom istraživanju može biti primjena humanih probavnih enzima budući su Zorić i sur. (2016) u svom istraživanju zaključili da je stabilnost ružmarinske kiseline manja u odnosu na istraživanja provedena uz korištenje komercijalnih probavnih enzima. *In vitro* istraživanja koja su se provodila uz korištenje humanih probavnih enzima vrlo su rijetka te se

najčešće provode na mliječnim proteinima. Dva su *in vitro* istraživanja uspoređivala utjecaj životinjskih i humanih gastrointestinalnih enzima te su dobili kontradiktorne rezultate. Eriksen i sur. (2010) istraživanje su proveli na kozjim proteinima sirutke te su zaključili da je životinjski pepsin bio efikasniji u odnosu na korištene humane želučane sokove, dok su Benedé i sur. (2014) zaključili da je razgradnja kravljeg kazeina bila brža uz korištenje humanih enzima.

5.3.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave

Stabilnost te potencijalna bioraspoloživost antioksidansa nakon probave od velike je važnosti, pa su mnoga istraživanja primjenom *in vitro* metoda probave analizirala antioksidacijsku stabilnost fenola raznih vrsta voća kao što su nar (Fawole i Opara, 2016), grožđe (Tagliazucchi i sur., 2010), aronija (Stanisavljević i sur., 2015), jabuka (Bouayed i sur., 2011), borovnica (Jiao i sur., 2018) i mnogih vrsta voćnih sokova (Ryan i Prescott, 2010; Quan i sur., 2018).

Antioksidacijska aktivnost nakon provedene *in vitro* probave određena je kao i u prvom dijelu istraživanja DPPH i FRAP metodama. Učinkovitost „gašenja“ DPPH radikala nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu prikazana je na Slici 26. Iz rezultata je vidljivo da je najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena za liofilizirani uzorak (nakon *in vitro* probave u želucu 17,86%, te nakon *in vitro* probave u tankom crijevu 14,42%) što je i očekivano s obzirom da je u liofiliziranom uzorku nakon *in vitro* probave u želucu izmjeren i najveći udio ukupnih fenola i svih fenolnih skupina te nakon *in vitro* probave u tankom crijevu najveći udio ukupnih fenola i flavonol glikozida. U prosjeku je antioksidacijska aktivnost, u odnosu na nativni uzorak, nakon prve faze probave u želucu porasla za 22% dok se nakon druge faze probave u tankom crijevu smanjila u prosjeku za 5%. U Tablici 37. prikazan je postotak povećanja ili smanjenja antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom nakon provedene *in vitro* probave. Najveći porast antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* probave u želucu određen je u netretiranom uzorku (za 72,45%; p=0,003), a osim toga značajno povećanje određeno je i u liofiliziranom uzorku te kod ukupno sedam ultrazvučno tretiranih uzoraka (A5 do A11). Najveći pad antioksidacijske aktivnosti određen je u pasteriziranom uzorku (za 32%), ali nije bio statistički značajan. Nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu samo je u pasteriziranom uzorku određeno značajno povećanje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na nativni uzorak (za gotovo 12%), dok je u netretiranom uzorku (-39,35%) te u ultrazvučno tretiranim uzorcima A6 i A8 određena značajno manja antioksidacijska

aktivnost. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima određivanja ukupnih fenola u kojima je također za netretirani uzorak uočen najveći pad ukupnih fenola nakon *in vitro* probave u tankom crijevu. Testiranje značajnosti razlika između antioksidacijske aktivnosti uzoraka dobivenih različitim metodama obrade nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu (Tablica 38.) potvrdilo je statistički značajnu razliku antioksidacijske aktivnosti između uzoraka ($p<0,001$). Zanimljivo je da je nakon provedene *in vitro* probave u želucu antioksidacijska aktivnost pasteriziranog uzorka bila značajno manja u odnosu na većinu ostalih uzoraka, dok je nakon *in vitro* probave u tankom crijevu, uz liofilizirani uzorak, izmjerena najveća antioksidacijska aktivnost. Već je u prethodnom poglavlju spomenuto da tretman termičkom obradom zbog formiranja Maillardovih produkata i promjena u strukturi fenola može povećati antioksidacijski kapacitet što može utjecati na veću stabilnost pri promjenama pH vrijednosti, uslijed čega dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* probave u tankom crijevu (Ryan i Prescott, 2010).

Rezultati određivanja redukcijske snage nakon *in vitro* probave korištenjem FRAP metode prikazani su na Slici 27. Najveća redukcijska snaga ponovo je izmjerena za liofilizirani uzorak (nakon *in vitro* probave u želucu 0,53 mmol Fe^{2+}, te nakon *in vitro* probave u tankom crijevu 0,35 mmol Fe^{2+}). Za razliku od rezultata dobivenih DPPH metodom, redukcijska snaga je u odnosu na nativne uzorke nakon prve faze probave u želucu u prosjeku porasla za 48% dok je nakon druge faze probave u tankom crijevu porasla čak i više (za 66%) što je vidljivo i iz rezultata prikazanih u Tablici 39. Nakon provedene *in vitro* probave u želucu u gotovo svim uzorcima došlo je do značajnog porasta redukcijske sposobnosti, dok u pasteriziranom te u ultrazvučno tretiranim uzorcima A1 i A2 smanjenje redukcijske snage nije bilo značajno. Nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu u svim uzorcima došlo je do značajnog porasta redukcijske snage u odnosu na nativni uzorak, dok u pasteriziranom uzorku nije uočena značajna promjena. Testiranje značajnosti razlika između uzoraka dobivenih različitim metodama obrade nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu (Tablica 40.) potvrdilo je statistički značajnu razliku redukcijske sposobnosti između uzoraka ($p<0,001$). Nakon provedene *in vitro* probave u želucu najmanja redukcijska snaga određena je za ultrazvučno tretirane uzorke A1 i A2, dok je najmanja redukcijska snaga nakon *in vitro* probave u tankom crijevu, kao i kod DPPH metode, određena je za netretirani uzorak.

Kao posljedica normalnog aerobnog metabolizma probavni sustav neprekidno je izložen reaktivnim oblicima kisika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) stoga, čak i ako se ne apsorbiraju, antioksidansi mogu imati važnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže gastrointestinalnog sustava prevenirajući time bolesti povezane s prekomjernim nakupljanjem

ROS radikala tijekom probave. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je da su fenoli oslobođeni tijekom simulirane *in vitro* probave bili u mogućnosti reducirati slobodne radikale što je utvrđeno DPPH i FRAP metodom. Antioksidacijska aktivnost najvećim djelom ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu koje doniraju vodik ali je ovisna i o pH vrijednosti medija. Pri višim (lužnatim) pH vrijednostima dolazi do deprotoniranja hidroksilnih skupina na aromatskim prstenovima čime dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti (Tagliazucchi i sur., 2010; Fawole i Opara, 2016), međutim, uz ovo i mnoga druga istraživanja potvrdila su nestabilnost fenolnih spojeva u lužnatim uvjetima. Mnogi autori navode da formirani metaboliti, kao posljedica strukturalnih promjena fenola u lužnatim pH uvjetima, također posjeduju antioksidacijska svojstva, ali ih nije moguće detektirati metodama koje određuju specifične strukturne oblike (Ryan i Prescott, 2010; Wootton-Beard i sur., 2011). Upravo radi toga, prethodne studije potvrdile su smanjenje pojedinih fenolnih spojeva nakon *in vitro* probave u tankom crijevu (Bermúdez-Soto i sur., 2007) ali ne i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (Fawole i Opara, 2016; Jiao i sur. 2018) što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Podsedek i sur. (2014) zaključili su da promjena strukture antocijana snažno utječe na njihov antioksidacijski kapacitet budući da unatoč značajnom povećanju antocijana nakon *in vitro* probave u želucu nisu uočili i značajan porast antioksidacijskog kapaciteta. Osim toga, nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu udio antocijana bio je manji za 87%, a antioksidacijski kapacitet za oko 50%.

Wootton-Beard i sur. (2011) pratili su gastrointestinalnu stabilnost antioksidacijskog kapaciteta 23 komercijalno dostupna soka uz pomoć DPPH i FRAP metodom. Nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu FRAP vrijednosti svih ispitivanih sokova značajno su porasle u odnosu na početne vrijednosti, dok je postotak inhibicije, mjeren DPPH metodom, pokazao velike varijacije. U cjelini, uočeno je blago povećanje postotka inhibicije nakon provedene prve faze probave u želucu te blago smanjenje postotka inhibicije nakon provedene druge faze probave u tankom crijevu, trend kakav je uočen i u ovom istraživanju. Zaštitni utjecaj matriksa hrane na fenole i njihovu antioksidacijsku aktivnost potvrdili su Koehnlein i sur. (2016) koji su ispitivali utjecaj *in vitro* probave na ukupno 36 najčešće konzumiranih namirnica u Brazilu iz skupina žitarica, mahunarki, povrća, voća, čokolade i napitaka. Udio fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost, određena FRAP metodom, nakon *in vitro* probave porasla je u svim skupinama namirnica, dok je samo u skupini napitaka (kava, čaj, pivo i vino) zabilježeno smanjenje sadržaja fenola kao i antioksidacijske aktivnosti. S obzirom na primijenjene metode za procjenu antioksidacijske aktivnosti u ovom istraživanju pretpostavlja se da je FRAP metoda, koja se provodi u kiselom mediju, prikladnija

za procjenu antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* probave u želucu, dok je DPPH metoda, koja se provodi u neutralnom mediju, prikladnija za procjenu antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* probave u tankom crijevu (Bouayed i sur., 2011).

Metodom korelacije ispitan je odnos sadržaja ukupnih fenola i pojedinih fenolnih skupina s antioksidacijskim kapacitetom u različitim fazama probave. Rezultati korelacije nakon provedene *in vitro* probave u želucu prikazani su u Tablici 41. Iz rezultata je vidljivo da FRAP vrijednosti bolje koreliraju s ukupnim fenolima (r=0,947) te svim testiranim fenolnim skupinama (r=0,847 – 0,915) s visokom razinom značajnosti (p<0,001) u odnosu na DPPH metodu. Nakon *in vitro* probave u tankom crijevu jaka pozitivna korelacija utvrđena je samo između FRAP vrijednosti te sadržaja ukupnih fenola (r=0,808; p<0,001) i flavonol glikozida (r=0,878, p<0,001), dok je jaka pozitivna korelacija DPPH vrijednosti utvrđena samo sa sadržajem flavonol glikozida (r=0,846, p<0,001) (Tablica 42).

S ciljem određivanja utjecaja primijenjenih metoda obrade i *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu na antioksidacijsku aktivnost provedena je analiza varijance. Dobiveni rezultati pokazuju da oba promatrana faktora značajno utječu na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH i FRAP metodama (Tablica 43).

5.3.3. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka nakon *in vitro* probave

Budući da je karcinom drugi vodeći uzrok smrti u Hrvatskoj (HZJZ, 2018) ali i u svijetu (WHO, 2018a) potencijalni antikancerogeni učinci fenolnih spojeva i drugih prirodnih bioaktivnih spojeva vrlo se aktivno istražuju. Mnoga istraživanja potvrdila su da fenoli bobičastog voća pokazuju značajnu *in vitro* i *in vivo* antitumorsku aktivnost na različitim vrstama staničnih linija karcinoma, ali samo nekoliko radova je pratilo antiproliferacijski utjecaj probavljenih ekstrakata bobičastog voća (Correa-Betanzo i sur., 2014; Stanisavljević i sur., 2015; Chen i sur., 2016; Jiao i sur., 2018; Giampieri i sur., 2018). Budući da je karcinom dojke najčešći tip karcinoma kod žena (HZJZ, 2018; WHO, 2018b) antiproliferacijska aktivnost uzoraka borovnice prije i nakon *in vitro* probave ispitana je na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231.

Jedan od najčešće korištenih *in vitro* testova za određivanje antiproliferacijske aktivnosti ispitivanog spoja primjenom staničnih kultura je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test). Antiproliferacijska aktivnost prije i nakon *in vitro* probave praćena je tijekom

perida od 4, 24, 48 i 72 sata, a rezultati su prikazani na Slikama 28. do 31. Najjača antiproliferacijska aktivnost fenola borovnice zabilježena je nakon 72 sata tretmana te je postotak redukcije staničnih linija u prosjeku iznosio 47,5% za nativne uzorke, 48,4% za uzorke nakon *in vitro* probave u želucu te 32,7% za uzorke nakon *in vitro* probave u tankom crijevu (Slika 31.). *In vitro* probava u želucu nije smanjila antiproliferacijsku aktivnost fenolnih spojeva borovnice u usporedbi s nativnim uzorcima (Tablica 44.) što je potvrđeno i u istraživanju koje su proveli Correa-Betanzo i sur. (2014). Međutim, nakon provedene *in vitro* probave u tankom crijevu antiproliferacijska aktivnost fenola se značajno smanjila nakon 48 i 72 sata ($p=0,007$) (Tablica 44) što je vidljivo i na Slikama 30. i 31. Iako se udio ukupnih fenola za većinu uzoraka nije značajno promijenio nakon *in vitro* probave u tankom crijevu, smanjena antiproliferacijska aktivnost moguća je zbog značajnog gubitka antocijana budući da od svih fenola prisutnih u borovnici antocijani najviše doprinose indukciji apoptoze stanica (Seeram i sur., 2006a).

Dobiveni rezultati u skladu su s nekoliko objavljenih istraživanja kojima je praćen utjecaj probave na antiproliferacijsku aktivnost bobičastog voća. Primjerice, probavljeni ekstrakti borovnice pokazali su potencijalnu inhibiciju rasta stanične linije kolorektalnog karcinoma (HT-29) (Correa-Betanzo i sur., 2014), dok su probavljeni ekstrakti maline su bili učinkoviti u smanjenju toksičnosti izazvane karcinogenom etil karbamatom na staničnim linijama epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) (Chen i sur., 2016). Probavljeni sok od aronije smanjio je proliferaciju Caco-2 stanične linije za 25% (Stanisavljević i sur., 2015). Jiao i sur. (2018) te Giampieri i sur. (2017) ispitivali su utjecaj probavljenog bobičastog voća na metaboličku aktivnost staničnih linija karcinoma jetre (HepG2). U prvom istraživanju citotoksični učinak praćen je tijekom perioda od 24 sata te je ustanovljeno značajno smanjenje citotoksičnog učinka probavljenog uzorka borovnice za čak 75% u odnosu na uzorak prije *in vitro* probave. Giampieri i sur. (2018) uočili su citotoksični učinak probavljenog bobičastog voća nakon perioda od 48 i 72 sata, dok u prvih 24 sata nije bilo promjena u metaboličkoj aktivnosti staničnih linija. S obzirom da su neki oblici karcinoma podložniji fiziološki nižim razinama fenolnih spojeva, razlike koje su uočene između provedenog istraživanja i ostalih istraživanja mogu se pripisati razlici u vrsti i koncentraciji fenolnih spojeva koji mogu djelovati na određene molekule ili signalne putove u specifičnim staničnim linijama karcinoma (Correa-Betanzo i sur., 2013; Fredotović i sur., 2017).

5.4. Utjecaj inkapsulacije na antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva borovnice

Osim suvremenih tehnologija prerade hrane koje se koriste za očuvanje fenola, upotreba različitih metoda inkapsulacije fenola i drugih fitokemikalija postala je iznimno važna za daljnju zaštitu tih nestabilnih spojeva i produljenje njihove biološke aktivnosti. U svrhu povećanja stabilnosti i antioksidacijske aktivnosti ekstrakti borovnice inkapsulirani su u dvije vrste mikroemulzija i liposome. Učinak inkapsulacije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta borovnice određen je Rancimat metodom.

5.4.1. Karakterizacija mikroemulzija i liposoma

Veličina i raspodjela kapljica predstavljaju jedne od najvažnijih faktora pri karakterizaciji mikroemulzija i liposoma, zbog njihovog utjecaja na svojstva emulgiranja, viskoznost i stabilnost. Emulzije korištene u ovom istraživanju pripremljene su primjenom mehaničkog i ultrazvučnog postupka homogenizacije u cilju postizanja veće stabilnosti cijelog emulzijskog sustava. Mikroemulzija 1 (ME-1) imala je veličinu kapljica 50,43±8,17nm i indeks polidisperznosti (PDI) 0,683±0,015, a mikroemulzija 2 (ME-2) 9,87±1,63nm i PDI vrijednost 0,722±0,023, što ukazuje da su formirane stabilne mikroemulzije. Na Slici 32. prikazana je raspodjela veličine kapljica prema intenzitetu, volumenu i broju za uzorke mikroemulzija. Fokusirajući se na raspodjelu veličine kapljica prema intenzitetu, veliki pikovi pri 1000 nm mogu biti uzrokovani malim brojem velikih čestica, obično nazvanih „prašina“ (eng. *dust*), koje su ujedno i razlog veće PDI vrijednosti. Potvrda navedene pretpostavke je i činjenica da tih pikova nema u raspodjeli veličine kapljica prema broju. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Jafari i sur. (2006) koji su zaključili da je, bez obzira na primijenjenu metodu pripreme emulzija, važno primijeniti optimalne uvjete kako bi formiranje emulzije bilo uspješno te kako ne bi došlo do povećanja veličine kapljica uslijed predugog tretmana (eng. *over-processing*).

Mjerenje električne vodljivosti vrlo je važna metoda za karakterizaciju mikroemulzija. Struktura mikroemulzijskog sustava („ulje u vodi“ ili „voda u ulju“) snažno korelira s njenom specifičnom električnom vodljivošću (Eicke i sur., 1989) koja je određena u ovom istraživanju. Električna vodljivost ME-1 iznosila je 0,035 mS/cm, a ME-2 0,028 mS/cm što ukazuje na formiranu mikroemulziju tipa „voda u ulju“ (Slika 32.). Izmjerena površinska napetost i indeks loma također su potvrdile da je u obje mikroemulzije formirana struktura „voda u ulju“ s

obzirom da su izmjerene vrijednosti vrlo bliske vrijednostima kontinuirane uljne faze. Veća viskoznost izmjerena za ME-2 (1,105 Pa s) ukazuje na mogućnost promjene sustava „voda u ulju“ u biokontinuiranu strukturu.

Vizualni pregled mikroemulzija provodio se tijekom perioda od 6 mjeseci, i to svaki tjedan tijekom perioda od prva 3 mjeseca te potom mjesečno tijekom preostala 3 mjeseca, prilikom čega nije uočeno razdvajanje faza kao niti sedimentacija niti floakulacija. Uzorci nisu pokazali znakove razdvajanja niti nakon centrifugiranja tijekom 20 minuta na 8000 rpm čime je potvrđena dobra stabilnost i homogenost pripremljenih mikroemulzija.

Liposomi pripremljeni u ovom istraživanju bili su srednjeg promjera 589,1±2,90 nm. Raspodjela veličine kapljica prema intenzitetu, volumenu i broju (Slika 33.) pokazala je monodisperznu distribuciju kapljica s PDI vrijednošću od 0,172±0,02. Dobivena vrijednost u skladu je s rezultatima istraživanja koje su proveli Isailović i sur. (2013) gdje su usporedbom više metoda pripreme liposoma ustvrdili da je proliposomskom metodom dobiven liposom najmanje PDI vrijednosti (<0,2) potvrđujući time njegovu učinkovitost i relevantnost u industrijskoj primjeni. Liposomske kapljice imale su negativan površinski naboj sa zeta potencijalom -39,31±0,90 što upućuje na dobru elektrostatičku stabilizaciju disperzije protiv agregacije (Isailović i sur., 2013; Rashidinejad i sur., 2014). To je potvrđeno i testom stabilnosti prema kojem se srednji promjer liposoma nije promijenio za više od 9% tijekom perioda od 3 tjedna čuvanja na +4 °C (podaci nisu prikazani).

Dodatkom ekstrakata borovnice u mikroemulzije i liposome nije došlo do promjene veličine kapljica. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Gibis i sur. (2014) koji su u liposome inkapsulirali ekstrakt hibiskusa, dok Chatzidaki i sur. (2015) navode da inkapsulacijom fenolnih spojeva u mikroemulzije dolazi do malih promjena hidrodinamičkog radijusa kapljica ali ne i indeksa polidisperznosti. Osim toga, inkapsulirani liposomi nisu pokazali značajnu promjenu srednjeg zeta potencijala što ukazuje da su fenoli smješteni unutar vezikula, najvjerojatnije preko vodikovih veza između polarnih grupa fenola i liposoma te hidrofobnim interakcijama između hidrofobnih skupina fenola i masnih kiselina na fosfolipidima liposoma (Gibis i sur., 2012). Učinkovitost inkapsulacije za pripremljene liposome iznosila je 70,5±0.8% što je u skladu s rezultatima inkapsulacije ekstrakt hibiskusa i zelenog čaja (Rashidinejad i sur., 2014; Gibis i sur., 2014).

5.4.2. Učinak inkapsuliranih ekstrakta borovnice na oksidacijsku stabilnost maslinovog ulja

Inkapsulirani ekstrakti borovnice pripremljeni mehaničkom homogenizacijom pokazali su značajno produljenje oksidacijske stabilnosti EDMU (Tablica 45). U usporedbi s kontrolnim uzorkom (EDMU obogaćeno samo mehanički homogeniziranom emulzijom) uočeno je da je EDMU bilo potrebno 9,41 sat da oksidira dok je EDMU obogaćenom inkapsuliranim ekstraktima u prosjeku trebalo 13,94 sati (s dodanom ME-1) i 13,46 sati (s dodanom ME-2), što je prosječno produljenje za 48,22% i 43,09% (p=0,012). Mikroemulzije pripremljene ultrazvučnim homogenizatorom pokazale su bolji učinak na produljenje oksidacijske stabilnost EDMU u odnosu na mikroemulzije pripremljene mehaničkim homogenizatorom. Minimalno produljenje oksidacijske stabilnosti EDMU obogaćeno fenolima inkapsuliranim u ultrazvučno pripremljenu ME-1 iznosilo je 20,86%, a maksimalno 114,08% (p=0,011). Dodatkom fenola inkapsuliranih u ultrazvučno pripremljenu ME-2 produljenje oksidacijske stabilnosti variralo je od 27,94% do 99,85% (p=0,011) (Tablica 45.). Dodatak liposoma s inkapsuliranim fenolima također je pokazao značajno produljenje oksidacije stabilnosti EDMU koje je u prosjeku iznosilo 43,68% (p=0,021) (Tablica 45).

Mohideen i sur. (2015b) ispitivali su utjecaj soka kultivirane borovnice na oksidaciju ribljeg ulja tijekom postupka inkapsulacije te ustanovili da je dodatak od 10% soka borovnice značajno smanjio oksidaciju lipida ribljeg ulja. Slično tome, Li i sur. (2015) pokazali su da se ekstrakt borovnice može uspješno primijeniti za smanjenje oksidacije lipida ulja riblje jetre tijekom inkapsulacije i skladištenja. Međutim, niti jedno istraživanje do sada nije ispitivalo primjenu ekstrakata kultivirane borovnice inkapsuliranih u mikroemulzije i liposome na produljenje oksidacijske stabilnosti jestivih ulja. Iako se očekivalo, korelacija između manje veličine kapljica (ME-2) i jačeg antioksidacijskog učinka nije ustanovljena. S obzirom na razliku u udjelu EDMU korištenog za pripremu ME-1 i ME-2, pretpostavlja se da je veći udio EDMU u ME-1 dao doprinos finalnim svojstvima pripremljene mikroemulzije zbog vlastitog sadržaja fenolnih spojeva (Giacintucci i sur., 2016). S obzirom da se bolji učinak mikroemulzija pripremljenih ultrazvučnom homogenizacijom, u odnosu na mikroemulzije pripremljene mehaničkom homogenizacijom, ne može objasniti na temelju provedenih analiza karakterizacije formiranih mikroemulzija, bilo bi potrebno provesti daljnja istraživanja o raspodjeli fenolnih spojeva unutar mikroemulzija, njihovoj raspodjeli u odnosu na površinu uzorka.

Uspoređujući dva sustava korištena za inkapsulaciju ekstrakata borovnice može se zaključiti da su mikroemulzije imale bolji učinak u odnosu na liposome. To se može objasniti

činjenicom da inkapsulirani fenoli sudjeluju u oksidacijskoj zaštiti fosfolipida u liposomu, djelujući kao čistači slobodnih radikala (Balanč i sur., 2015), što je i potvrđeno u slučaju inkapsulacije resveratrola, rutina i kvercetina inhibicijom formiranja sekundarnih produkata lipidne oksidacije (Cesquini i sur., 2003; Balanč i sur., 2015). U tom smislu, antioksidacijski kapacitet fenola vjerojatno je djelomično uključen i u sprječavanje peroksidacije fosfolipida, dok je u slučaju mikroemulzija njihov antioksidacijski potencijal u potpunosti uključen u zaštitu oksidacijske stabilnosti EDMU.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata ovog istraživanja te provedene rasprave mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Najveća koncentracija ukupnih fenola određena je u liofiliziranom nativnom uzorku i ekstraktu. Tijekom ultrazvučne obrade kaše borovnice u pravilu je degradirano manje fenolnih spojeva nego primjenom klasične termičke obrade.

- U netretiranom i svim ultrazvučno tretiranim nativnim uzorcima najzastupljeniji fenolni spojevi su antocijani, dok su u liofiliziranom i pasteriziranom uzorku najzastupljenije fenolne kiseline.

- U ekstraktima su, neovisno o metodi obrade, antocijani najzastupljeniji fenolni spojevi, među kojima je u svim uzorcima malvidin-3-glikozid određen u najvišim koncentracijama. Delfinidin-3-glukozid jedini je antocijan određen samo u ultrazvučno tretiranim nativnim uzorcima i ekstraktima.

- Najveću redukcijsku snagu izmjerenu prema FRAP metodi i učinkovitost u 'gašenju' molekula slobodnog DPPH radikala u nativnim uzorcima i ekstraktima pokazao je liofilizirani uzorak.

- Liofilizacija se pokazala i najučinkovitijom metodom za smanjenje aktivnosti enzima polifenol oksidaze čija je aktivnost smanjena za čak 93%, dok je ultrazvučnom obradom postignut najslabiji učinak pri čemu je aktivnost enzima smanjena za 43%.

- Određena je visoka stabilnost fenolnih spojeva iz borovnice nakon provedene *in vitro* želučane faze probave s humanim probavnim enzimima, s tim da je liofilizirani uzorak imao veću stabilnost fenolnih spojeva u odnosu na druge uzorke.

- Nakon *in vitro* probave u tankom crijevu značajno smanjenje ukupnih fenola određeno je samo u netretiranom uzorku, a u većini ostalih uzoraka udio ukupnih fenola ostao nepromijenjen, s tim da je liofilizirani uzorak imao veću stabilnost fenolnih spojeva u odnosu na druge uzorke.

- Gubitak antocijana nakon *in vitro* probave u tankom crijevu u svim uzorcima bio je potpun, osim ultrazvučno tretiranog uzorka A4 (amplituda 100%; 9 minuta). Gubitak flavonol glikozida u prosjeku je iznosio 60% a najveći gubitak određen je u netretiranom uzorku.

- Udio fenolnih kiselina nakon *in vitro* probave u tankom crijevu porastao je u svim ultrazvučno tretiranim uzorcima, dok je u netretiranom ostao nepromijenjen a u liofiliziranom i pasteriziranom uzorku se smanjio.

- Primjena postupka liofilizacije i ultrazvuka visokog intenziteta mogu osigurati bolju gastrointestinalnu stabilnost fenolnih spojeva borovnice.

- Najveća redukcijska snaga izmjerena prema FRAP metodi i učinkovitost u 'gašenju' molekula slobodnog DPPH radikala nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu određena je za liofilizirani uzorak, dok je najslabija antioksidacijska aktivnost nakon *in vitro* probave u tankom crijevu određena za netretirani uzorak. Fenolni spojevi borovnice nakon *in vitro* probave još uvijek posjeduju antioksidacijska svojstva koja mogu biti izravno povezana s njihovim povoljnim učincima na zdravlje.

- *In vitro* probava u želucu nije imala učinak na antiproliferacijsku aktivnost fenolnih spojeva borovnice, dok je značajno smanjenje aktivnosti uočeno nakon *in vitro* probave u tankom crijevu nakon perioda od 48 i 72 sata.

- Fenolni ekstrakti borovnice pokazali su vrlo slab učinak na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja određenoj prema Rancimat metodi.

- Ekstrakti borovnice inkapsulirani u mikroemulzije i liposome pokazali su značajno produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja, s tim da se primjena mikroemulzija pokazala nešto boljom u odnosu na primjenu liposoma.

- Inkapsulirani fenolni spojevi iz borovnice mogu se smatrati potencijalnim kandidatima za očuvanje oksidacijske stabilnosti ulja i kao takvi mogu naći svoju svrhu u kreiranju novih proizvoda na bazi masti i ulja obogaćenih prirodnim biološkim aktivnim spojevima.

7. LITERATURA

1. Aadil, R.M.; Zeng, X.A.; Han, Z.; Sun, D.W. (2013) Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, **141**, 3201-3206.
2. AAFC (Agriculture and Agri-Food Canada) (2016) Blueberries in the European Union. Dostupno na: http://www.agr.gc.ca/resources/prod/Internet-Internet/MISB-DGSIM/ATS-SEA/PDF/6719-eng.pdf. Pristupljeno 29. studenog 2017.
3. Adams, L.S.; Phung, S.; Yee, N.; Seeram, N.P.; Li, L.; Chen, S. (2010) Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Research*, **70**, 3594-3605.
4. Afrin, S.; Gasparrini, M.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Reboredo-Rodriguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-Lopez, A.; Giampieri, F.; Battino, M. (2016) Promising health benefits of the strawberry: A focus on clinical studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 4435-4449.
5. Aladedunye, F.; Kersting, H.J.; Matthäus, B. (2014a) Phenolic extract from wild rose hip with seed: Composition, antioxidant activity, and performance in canola oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 1025-1034.
6. Aladedunye, F.; Przybylski, R.; Niehaus, K.; Bednarz, H.; Matthäus, B. (2014b) Phenolic extracts from *Crataegus* × *mordenensis* and *Prunus virginiana*: Composition, antioxidant activity and performance in sunflower oil. *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 308-319.
7. Almaas, H.; Cases, A.L.; Devold, T.G.; Holm, H.; Langsrud, T.; Aabakken, L.; Aadnoey, T.; Vegarud, G.E. (2006) In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, **16**, 961-968.
8. Alminger, M.; Aura, A.M.; Bohn, T.; Dufour, C.; El, S.N.; Gomes, A.; Karakaya, S.; Martínez-Cuesta, M.C.; Mcdougall, G.J.; Requena, T.; Santos, C.N. (2014) *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**, 413-436.
9. Aehle, E.; Müller, U.; Eklund, P.C.; Willför, S.M.; Sippl, W.; Dräger, B. (2011) Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, **72**, 2396-2405.
10. Amar, I.; Aserin, A.; Garti, N. (2003) Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4775-4781.

11. Amerine, M.A; Ough, C.S. (1980) *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley, New York.
12. Anonimous (2016) Borovnica, <https://www.plantea.com.hr/borovnica/>. Pristupljeno 28. studenog 2017.
13. Ariza, M.T.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Soria, C.; Martínez-Ferri, E.; Battino, M. (2017) Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on strawberry polyphenols stability. *Acta Horticulturae*, **1156**, 389-396.
14. Arroyo, C.; Lyng, J.G. (2017) The Use of Ultrasound for the Inactivation of Microorganisms and Enzymes. U: *Ultrasound in Food Processing - Recent Advances*, Villamiel i sur. (ured.), Willey Blackwell, West Sussex, UK, 258-278.
15. Asami, D.K.; Hong, Y.J.; Barett, D.M.; Mitchell, A.E. (2003) Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1237-1241.
16. Asnaashari, M.; Tajik, R.; Khodaparast, M.H.H. (2015) Antioxidant activity of raspberry (Rubus fruticosus) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology - Mysore*, **52**, 5180–5187.
17. Balanč, B.D.; Ota, A.; Djordjević, V.B.; Šentjurc, M.; Nedović, V.A., Bugarski, B.M.; Ulrih, N.P. (2015) Resveratrol-loaded liposomes: interaction of resveratrol with phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **117**, 1615-1626.
18. Baoguo, X.; Zhang, M.; Haile, M. (2017) Food Freezing Assisted With Ultrasound. U: *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation*, Bermundez-Aguirre, D. (ured.), Academic Press, London, UK, 293-317.
19. Barba, F.J.; Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N.; Mercadante, A.Z.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Orlien, V. (2017) Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, **67**, 195-206.
20. Başlar, M.; Ertugay, M.F. (2013) The effect of ultrasound and photosonication treatment on polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**, 886-892.
21. Basu, A.; Du, M.; Leyva, M.J.; Sanchez, K.; Betts, N.M.; Wu, M.; Aston, C.E.; Lyons, T.J. (2010) Blueberries Decrease Cardiovascular Risk Factors in Obese Men and Women with Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*, **140**, 1582-1587.

22. Basu, A.; Lyons, T.J. (2012) Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: Clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 5687-5692.
23. Belitz H.D.; Grosch W.; Schierberle P. (2004) Food Chemistry. 3. izdanje, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Njemačka, 806-860.
24. Benedé, S.; López-Expósito, I.; Giménez, G.; Grishina, G.; Bardina, L.; Sampson, H.A.; Molina, E.; López-Fandiño, R. (2014) *In vitro* digestibility of bovine β-casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food Chemistry*, **143**, 514-521.
25. Benzie, I.F.F; Strain, J.J. (1999) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
26. Bermúdez-Soto, M.J.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.T. (2007) Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, **102**, 865-874.
27. Bilušić, T.; Blažević, I.; Dropulić, A.M.; Markić, J.; Bratanić, A.; Kokeza, A. (2019) Gastrointestinal stability of carotenoids from raw and freeze-dried vegetables. *Italian Journal of Food Science*, **31**, 172-183.
28. Boath, A.S.; Grussu, D.; Stewart, D.; McDougall, G.J. (2012) Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: A source of potential health benefits? *Food Digestion*, **3**, 1-7.
29. Bohn, T. (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, **72**, 429-452.
30. Bohn, T.; Mcdougall, G.J.; Alegría, A.; Alminger, M.; Arrigoni, E.; Aura, A.M.; Brito, C.; Cilla, A.; El, S.N.; Karakaya, S.; Martínez-Cuesta, M.C.; Santos, C.N. (2015) Mind the gap – deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites – a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, **59**, 1307-1323.
31. Bouayed, J.; Deußer, H.; Hoffmann, L.; Bohn, T. (2012) Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, **131**, 1466-1472.
32. Bouayed, J.; Hoffmann, L.; Bohn, T. (2011) Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, **128**, 14-21.

33. Bouaziz, M.; Feki, I.; Ayadi, M.; Jemai, H.; Sayadi, S. (2010) Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 894–905.
34. Brownmiller, C.; Howard L.R.; Prior R.L. (2008) Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Food Science*, **73**, 72-79.
35. Bursać-Kovačević, D. (2010) *Utjecaj sorte, uzgoja i prerade na stabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet jagode*. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 20-43.
36. Buchholz, T.; Melzig, M.F. (2015) Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors. *Planta Medica*, **81**, 771-783.
37. Caddeo, C.; Teskac, K.; Sinico, C.; Kristl, J. (2008) Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*, **363**, 183-191.
38. Candrawinata, V.I., Golding, J.B., Roach, P.D., Stathopoulos, C.E. (2014) Total phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extract: effect of time, temperature and water to pomace ratio. *International Food Research Journal*, **21**, 2337-2344.
39. Cao, X.; Cai, C.; Wang, Y.; Zheng, X. (2018) The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **45**, 169-178.
40. Cassani, L.; Gerbino, E.; Moreira, M.R.; Gómez-Zavaglia, A. (2018) Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after *in vitro* gastrointestinal digestion of fiber-enriched strawberry juices. *Journal of Functional Foods*, **40**, 128-136.
41. Cassidy, A.; O'Reilly, É.J.; Kay, C.; Sampson, L.; Franz, M.; Forman, J.P.; Curhan, G.; Rimm, E.B. (2011) Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, **93**, 338-347.
42. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, **113**, 859-871.
43. Castrejón, A. D. R.; Eichholz, I.; Rohn, S.; Kroh, L. W.; Huyskens-Keil, S. (2008) Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, **109**, 564-572.

44. Cesquini, M.; Torsoni, M.A.; Stoppa, G.R.; Ogo, S.H. (2003) t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **57**, 124-129.
45. Cevc, G.; Blume, G. (2004) Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1663**, 61-73.
46. Chatzidaki, M.D.; Mitsou, E.; Yaghmur, A.; Xenakis, A.; Papadimitriou, V. (2015). Formulation and characterization of food-grade microemulsions as carriers of natural phenolic antioxidants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **483**, 130-136.
47. Chemat, F.; Zill-E-Huma; Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**, 813-835.
48. Chen, W.; Xu, Y.; Zhang, L.; Li, Y.; Zheng, X. (2016) Wild Raspberry Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion Improves the Protective Capacity against Ethyl Carbamate-Induced Oxidative Damage in Caco-2 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 3297363.
49. Chen, Y.; Yu, L.J.; Rupasinghe, H.P.V. (2013) Effect of thermal and non-thermal pasteurisation on the microbial inactivation and phenolic degradation in fruit juice: A mini-review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 981–986.
50. Cheng, X.; Zhang, M.; Adhikari, B. (2014) Changes in Quality Attributes of Strawberry Purees Processed by Power Ultrasound or Thermal Treatments. *Food Science and Technology Research*, **20**, 1033-1041.
51. Chizoba Ekezie, F.-G.; Sun, D.-W.; Han, Z.; Cheng, J.-H. (2017) Microwave-assisted food processing technologies for enhancing product quality and process efficiency: A review of recent developments, *Trends in Food Science & Technology*, **67**, 58-69.
52. Cho, M.J.; Howard, L.R.; Prior, R.L.; Clark, J.R. (2004) Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**, 1771-1782.
53. Correa-Betanzo, J. (2013) *Evaluation of food matrix interactions and in vitro gastrointestinal digestion on the bioefficacy of polyphenols from blueberries (Vaccinium sp.)*. Doktorska disertacija, The University of Guelph, Canada, 34-43.

54. Correa-Betanzo, J.; Allen-Vercoe, E.; McDonald, J.; Schroeter, K.; Corredig, M.; Paliyath, G. (2014) Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, **165**, 522-531.
55. Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D.J.; Preston, T.; Kroon, P.A.; Botting, N.P.; Kay, C.D (2013) Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ^{13}C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **97**, 995-1003.
56. Dalmau, M.E.; Bornhorst, G.M.; Eim, V.; Rosselló, C.; Simal, S. (2017) Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, **215**, 7-16.
57. Del Rio, D.; Borges, G.; Crozier, A. (2010) Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British journal of nutrition*, **104**, S67-S90.
58. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & redox signaling*, **18**, 1818-92.
59. Desai, K.G.H.; Park, H.J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, **23**, 1361-94.
60. Deng, J.; Yang, H.; Capanoglu, E.; Cao, H.; Xiao, J. (2018) Technological aspects and stability of polyphenols. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, Galanakis, C. (ur.), Woodhead Publishing: Duxford, Cambridge, UK, 295-323.
61. Dragović-Uzelac, V.; Savić, Z.; Brala, A.; Levaj, B.; Kovačević, D. B.; Biško, A. (2010). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars *(Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnology*, **48**, 214-221.
62. Drmić, H.; Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, **2**, 22-33.
63. Drvenica, I.; Đorđević, V.; Trifković, K.; Bojana, B.; Steva, L.; Bugarski, B.; Nedović, V. (2017). Industry-Relevant Encapsulation Technologies for Food and Functional Food Production. U: *Thermal and Nonthermal Encapsulation Methods*, 1. izdanje, M. Krokida (ured.), CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 221–263.
64. Duan, X.; Yang, X.; Ren, G.; Pang, Y.; Liu, L.; Liu, Y. (2016) Technical aspects in

freeze-drying of foods. *Drying Technology*, **34**, 1217-1285.

65. Dubrović, I., Herceg, Z., Jambrak, A. R., Badanjak, M., Dragović-Uzelac, V. (2011) Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanin content in strawberry juice. *Food Technology and Biotechnology*, **49**, 196-204.
66. Dujmović Purgar, D.; Šindrak, Z.; Mihelj, D.; Voća, S.; Duralija, B. (2007) Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Polmologia Croatica*, **13**, 219-228.
67. Đorđević, V.; Balanč, B.; Belščak-Cvitanović, A.; Lević, S.; Trifković, K.; Kalušević, A. (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds, *Food Engineering Reviews*, **7**, 452-490.
68. Eicke, H.F.; Borkovec, M.; Das-Gupta, B. (1989) Conductivity of water-in-oil microemulsions: a quantitative charge fluctuation model. *The Journal of Physical Chemistry*, **93**, 314-317.
69. Emami, S.; Azadmard-Damirchi, S.; Peighambardoust, S.H.; Valizadeh, H.; Hesari, J. (2016) Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience*, **11**, 737-759.
70. Eriksen, E.K.; Holm, H.; Jensen, E.; Aaboe, R.; Devold, T.G.; Jacobsen, M.; Vegarud, G.E. (2010) Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, **104**, 374-381.
71. Evans, M.; Sharma, P.; Guthrie, N. (2012) Bioavailability of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Biological Role in Metabolic Syndrome and Hyperlipidemia, U: *Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications*, Noreddin, A. (ured.), InTech: Rijeka, Hrvatska, 267-285.
72. Fabroni, S.; Ballistreri, G.; Amenta, M.; Romeo, F.V.; Rapisarda, P. (2016) Screening of the anthocyanin profile and *in vitro* pancreatic lipase inhibition by anthocyanin-containing extracts of fruits, vegetables, legumes and cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**, 4713-4723.
73. Fang, Z.; Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 510-523.
74. FAO (Food and Agriculture Organization) (2016) *Crops Production*. Dostupno na: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Pristupljeno: 15. prosinca 2018.
75. Fawole, O.A.; Opara, U.L. (2016) Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to *in vitro* digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**, 358.

76. Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S.E. (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, **45**, 7-18.
77. Fredotović, Ž.; Šprung, M.; Soldo, B.; Ljubenkov, I.; Budić-Leto, I.; Bilušić, T.; Čikeš-Čulić, V.; Puizina, J. (2017) Chemical Composition and Biological Activity of *Allium cepa* L. and *Allium x cornutum* (Clementi ex Visiani 1842) Methanolic Extracts. *Molecules*, **22**, 448.
78. Furlund, C.B.; Ulleberg, E.K.; Devold, T.G.; Flengsrud, R.; Jacobsen, M.; Sekse, C.; Holm, H.; Vegarud, G.E. (2013) Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. *Journal of Dairy Science*, **96**, 75-88.
79. Gao, L.; Mazza, G. (1994) Quantitation and Distribution of Simple and Acylated Anthocyanins and Other Phenolics in Blueberries. *Journal of Food Science*, **59**, 1057-1059.
80. Ghasemzadeh, A. i Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 6697-6703.
81. Ghasemzadeh, A.; Jaafar, H.Z.E.; Rahmat, A. (2016) Variation of the phytochemical constituents and antioxidant activities of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade associated with different drying methods and polyphenol oxidase activity. *Molecules*, **21**, 780.
82. Giacintucci, V.; Di Mattia, C.; Sacchetti, G.; Neri, L.; Pittia, P. (2016) Role of olive oil phenolics in physical properties and stability of mayonnaise-like emulsions. *Food Chemistry*, **213**, 369–377.
83. Giampieri, F.; Afrin, S.; Stewart, D.; Mcdougall, G.J.; Brennan, R.; Blyth, L.; Gasparrini, M.; Mazzoni, L.; Capocasa, F.; Alvarez-Suarez, J.M.; Bompadre, S.; Bras de Oliveira, P.N.; Santos, C.N.; Masias, M.; Agudo, P.; Crespo, J.; Mezzetti, B.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Battino, M. (2018) Phytochemical Composition and Cytotoxic Effects on Liver Hepatocellular Carcinoma Cells of Different Berries Following a Simulated *In Vitro* Gastrointestinal Digestion. *Molecules*, **23**, 1918.
84. Gibis, M.; Vogt, E.; Weiss, J. (2012) Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & Function*, **3**, 246-254.
85. Gibis, M.; Zeeb, B.; Weiss, J. (2014) Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, **38**, 28-39.

86. Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F.A. (2002) An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, **214**, 155-159.
87. Giovanelli, G.; Buratti, S. (2009) Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, **112**, 903-908.
88. Golmohamadi, A.; Möller, G.; Powers, J.; Nindo, C. (2013) Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**, 1316-1323.
89. Gómez-Mascaraque, L.G.; Casagrande Sipoli, C.; de La Torre, L.G.; López-Rubio, A. (2017) Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chemistry*, **233**, 343-350.
90. Gortzi, O.; Lalas, S.; Chinou, I.; Tsaknis, J. (2008) Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of Myrtus communis extract before and after encapsulation in liposomes. *European Food Research and Technology*, **226**, 583-590.
91. Gortzi, O.; Lalas, S.; Tsaknis, J.; Chinou, I. (2007.) Enhanced bioactivity of Citrus limon (Lemon Greek cultivar) extracts, essential oil and isolated compounds before and after encapsulation in liposomes. *Planta Medica*, **73**, 184.
92. Gramza, A.; Korczak, J.; Amarowicz, R. (2005) Tea polyphenols-their antioxidant properties and biological activity - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **14**, 219-235.
93. Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. L. (2004) Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *The Journal of Nutrition*, **134**, 613-617.
94. Guerrouj, K.; Sanchez-Rubio, M.; Taboada-Rodriguez, A.; Cava-Roda, R.M.; Marin-Iniesta, F. (2016) Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, **99**, 20-28.
95. Haminiuk, C.W.I; Maciel, G.M.; Plata-Oviedo, M.S.V.; Peralta, R.M. (2012) Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 2023-2044.
96. Helrich, K. (1990) *Official Methods of Analysis: 930.04 Moisture Content in Plants*, 15. izdanje, AOAC: Arlington, Virginia, USA.

97. Howard, L.R.; Hager, T.J (2007) Berry fruit phytochemicals. U: *Berry fruit: value-added products for health promotion*, Zhao, Y. (ured.) CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 73-104.
98. Huang, H.; Chen, G.; Liao, D.; Zhu, Y.; Xue, X. (2016) Effects of Berries Consumption on Cardiovascular Risk Factors: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials. *Scientific Reports*, **6**, 23625.
99. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
100. Hussain, T.; Tan, B.; Yin, Y.; Blachier, F.; Tossou, M.C.B.; Rahu, N. (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, Article ID 7432797.
101. Hwang, S.J.; Yoon, W.B.; Lee, O.H.; Cha, S.J.; Kim, J.D. (2014) Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, **146**, 71-77.
102. HZJZ (Hrvatski zavod za javno zdravstvo) (2018) Stanovništvo i vitalni događaji. U: *Hrvatski zdravstveno statistički ljetopis za 2017. godinu*, Stevanović, R., Capak, K (ur.) Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Zagreb, Hrvatska, str 9-17.
103. Isailović, B.D.; Kostić, I.T.; Zvonar, A.; Đordević, V.B.; Gašperlin, M.; Nedović, V.A.; Bugarski, B.M. (2013) Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **19**, 181-189.
104. Jacob, J.K.; Tiwari, K.; Correa-Betanzo, J.; Misran, A.; Chandrasekaran, R.; Paliyath, G. (2012) Biochemical Basis for Functional Ingredient Design from Fruits. *Annual Review of Food Science and Technology*, **3**, 79-104.
105. Jang, J.; Moon, K. (2011) Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on freshcut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, **124**, 444-449.
106. Jafari, S.M.; He, Y.; Bhandari, B. (2006) Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *International Journal of Food Properties*, **9**, 475-485.
107. Jiao, X.; Li, B.; Zhang, Q.; Gao, N.; Zhang, X.; Meng, X. (2018) Effect of *in vitro*-simulated gastrointestinal digestion on the stability and antioxidant activity of blueberry polyphenols and their cellular antioxidant activity towards HepG2 cells. *International Journal of Food Science & Technology*, **53**, 61-71.

108. Johansson, Ö.; Pamidi, T.; Khoshkhoo, M.; Sandström, Å. (2017) Sustainable and energy efficient leaching of tungsten (W) by ultrasound controlled cavitation. Research report / Luleå University of Technology, 20.
109. Jurkin, T.; Gotić, M. (2013) Uvod u mikroemulzije. Kemija u industriji, 62, 389-399.
110. Kader, F.; Rovel, B.; Girardin, M.; Metche, M. (1997) Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.) role of blueberry polyphenol oxidase, chlorogenic acid and anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **74**, 31–34.
111. Kaić-Rak, A.; Antonić, K. (1990) Tablice o sastavu namirnica i pića. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb.
112. Karaś, M.; Jakubczyk, A.; Szymanowska, U.; Złotek, U.; Zielińska, E. (2016) Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science and Technology*, **52**, 291-305.
113. Keenan, D.F.; Tiwari, B.K.; Patras, A.; Gormley, R.; Butler, F.; Brunton, N.P. (2012) Effect of sonication on the bioactive, quality and rheological characteristics of fruit smoothies. *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 827-836.
114. Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R. (1996) Effect of Sample Preparation Method on Birch (*Betula pendula* Roth) Leaf Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2724-2727.
115. Khanal, R.C.; Howard, L.R.; Prior, R.L. (2010) Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, **43**,1464-1469.
116. Khoddami, A.; Wilkes, M.A; Roberts, T. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, **18**, 2328-2375.
117. Kirakosyan, A.; Seymour, E.M.; Urcuyo Llanes, D.E.; Kaufman, P.B.; Bolling, S.F. (2009) Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products. *Food Chemistry*, **115**, (1), 20-25.
118. Kim, Y.A.; Keogh, J.B.; Clifton, P.M. (2016) Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*, **8**, 2016.
119. Knorr, D.; Zenker, M.; Heinz, V.; Lee, D.U. (2004) Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 261-266.
120. Koehnlein, E.A.; Koehnlein, E.M.; Correa, R.C.G.; Nishida, V..; Correa, V.G.; Bracht, A.; Peralta, R.M. (2016) Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. *International*

Journal of Food Sciences and Nutrition, **67**, 614-623.

121. Komatsu, Y., Suematsu, S., Hisanobu, Y., Saigo, H., Matsuda, R., Hara, K., 1993. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* **57**, 907-910.
122. Kraujalyte, V.; Venskutonis, P.R.; Pukalskas, A.; Česoniene, L.; Daubaras, R. (2015) Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, **188**, 583-590.
123. Kulišić-Bilušić, T.; Katalinić, V.; Dragović-Uzelac, V.; Ljubenkov, I.; Kriško, A.; Dejanović, B.; Jukić, M.; Politeo, O.; Pifat, G.; Miloš, M. (2008) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions *in vitro*. *Food Technology and Biotechnology,* **46**, 368-375.
124. Jakobek, L. (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, **175**, 556-567.
125. Lamikanra, O.; Watson, M.A. (2001) Effects of ascorbic acid on peroxidase and polyphenoloxidase activities in fresh-cut cantaloupe melon. *Journal of Food Science,* **66**, 1283-1286.
126. Landete, J.M. (2012) Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 936-948.
127. Lapornik, B.; Prošek, M.; Wondra, A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering,* **71**, 214-222.
128. Laurent, C; Besancon, P.; Caporiccio, B. (2007) Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, **100**, 1704-1712.
129. Li, D.; Li, B.; Ma, Y.; Sun, X.; Lin, Y.; Meng, X. (2017) Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, **62**, 84-93.
130. Li, J.; Solval, K.M.; Alfaro, L.; Zhang, J.; Chotiko, A.; Delgado, J.L.B.; Chouljenko, A.; Bankston, D.; Bechtel, P.J.; Sathivel, S. (2015) Effect of blueberry extract from blueberry pomace on the microencapsulated fish oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, **39**, 199-206.
131. Liapis, A.I.; Bruttini, R. (2014) Freeze Drying. U: *Handbook of Industrial Drying*, 4. izdanje, Mujumdar, A.S. (ured.) CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 259-282.

132. Lim, Y.Y.; Murtijaya, J. (2007) Antioxidant properties of Phyllanthus amarus extracts as affected by different drying methods. *LWT - Food Science and Technology*, **40**, 1664-1669.
133. Liu, S.; Xu, Q.; Li, X.; Wang, Y.; Zhu, J.; Ning, C.; Chang, X.; Meng, X. (2016) Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical properties, enzymes activity, and antioxidant capacities of anthocyanins extracts of wild *Lonicera caerulea* berry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **36**, 48-58.
134. Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus: Zagreb, Hrvatska, 212-226.
135. Lu, W.; Kelly, A.L.; Miao, S. (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, **47**, 1-9.
136. Luque-Rodríguez, J.M.; Pérez-Juan, P.; Luque de Castro, M. (2006) Extraction of Polyphenols from Vine Shoots of *Vitis vinifera* by Superheated Ethanol-Water Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8775-8781.
137. Macierzanka, A.; Sancho, A.I.; Mills, E.N.C.; Rigby, N.M.; Mackie, A.R. (2009) Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β-casein and β-lactoglobulin. *Soft Matter*, **5**, 538-550.
138. Maier, T.; Fromm, M.; Schieber, A.; Kammerer, D.R.; Carle, R.; (2009) Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, **229**, 949-960.
139. Manach, C. (2004) Polyphenols : food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.
140. Mach, C.; Mathew, L.; Mosley, S.A.; Kurzrock, R.; Smith, J.A. (2009) Determination of minimum effective dose and optimal dosing schedule for liposomal curcumin in a xenograft human pancreatic cancer model. *Anticancer Research*, **29**, 1895-1899.
141. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 230S-42S.
142. Marsanasco, M.; Marquez, A.L.; Wagner, J.R.; del Alonso, V.S.; Chiaramoni, N.S. (2011) Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, **44**, 3039-46.
143. Materska, M. (2014) Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy

pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Functional Food*, **7**, 269-277.

144. McClements, D.J. (2012) Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, **8**, 1719-1729.
145. McClements, D.J. (2016) Food Emulsions – principles, practices, and techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 1-26.
146. McDougall, G.J.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. (2007) Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, **68**, 1285-1294.
147. Medina-Meza, I.G.; Boioli, P.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2016) Assessment of the Effects of Ultrasonics and Pulsed Electric Fields on Nutritional and Rheological Properties of Raspberry and Blueberry Purees. *Food and Bioprocess Technology*, **9**, 520-531.
148. Mejía-Meza, E.I.; Yánez, J.A.; Davies, N.M.; Rasco, B.; Younce, F.; Remsberg, C.M.; Clary, C. (2008) Improving nutritional value of dried blueberries (*Vaccinium Corymbosum* L.) combining microwave-vacuum, hot-air drying and freeze drying technologies. *Inernational Journal of Food Engineering*, **4**, doi:10.2202/1556-3758.1364
149. Mena, P.; Domínguez-Perles, P.; Gironés-Vilaplana, A.; Baenas, N.; García-Viguera, C.; Villaño, D. (2014) Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. *IUBMB Life*, **66**, 745-758.
150. Messina, M. (2014) Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **100**, 423S-430S.
151. Michalska, A.; Łysiak, G. (2015) Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 18642-18663.
152. Miller, D.D.; Schricker, B.R.; Rasmussen, R.R.; Van Campen, D. (1981) An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 2248-56.
153. Mitić, M.N.; Obradović, M.V.; Kostić, D.A.; Micić R.J.; Pecev, E.T. (2012) Polyphenol content and antioxidant activity of sour cherries from Serbia. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly,* **18** (1) 53-62.
154. Moghimipour, E.; Aghel, N.; Mahmoudabadi, A.Z.; Ramezani, Z.; Handali, S. (2012) Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of Eucalyptus camaldulensis leaf. *Journal of Natural Pharmaceutical Products*, **7**, 117-122.
155. Moharram, H.A.; Youssef, M.M. (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, **11**, 31-42.

156. Mohideen, F.W.; Solval, K.M.; Li, J.; Zhang, J.; Chouljenko, A.; Chotiko, A.; Prudente, A.D.; Bankston, J.D.; Sathivel, S. (2015a) Effect of continuous ultra-sonication on microbial counts and physico-chemical properties of blueberry (Vaccinium corymbosum) juice. *LWT - Food Science and Technology*, **60**, 563-570.
157. Mohideen, F.W.; Stine, J.; Bechtel, P.J.; Solval, K.M.; Bankston, J.D.; Sathivel, S. (2015b) Effects of Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) Juice on Lipid Oxidation During Spray Drying of Microencapsulated Menhaden Oil. *International Journal of Food Properties*, **18**, 1139-1153.
158. Morais, R.M.S.C.; Morais, A.M.M.B.; Dammak, I.; Bonilla, J.; Sobral, P.J.A.; Laguerre, J.; Afonso, M.J.; Ramalhosa, E.C.D. (2018) Functional Dehydrated Foods for Health Preservation. *Journal of Food Quality*, **2018**, Article ID 1739636.
159. Mordor Intelligence (2018) Freeze Dried Food Market – Growth Trends and Forecast (2019-2024). Dostupno na: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/freeze-dried-food-market. Pristupljeno: 5. siječnja 2019. godine.
160. Moreira, D.P.; Monteiro, M.C.; Ribeiro-Alves, M.; Donangelo, C.M.; Trugo, L.C. (2005) Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1399-1402.
161. Moses, J.A.; Rajauria, G.; Tiwari, B.K. (2017) Effect of Ultrasound on Anthocyanins. U: *Ultrasound in Food Processing - Recent Advances*, Villamiel i sur. (ured.), Willey Blackwell, West Sussex, UK, 485-499.
162. Moyer, R.A.; Hummer, K.E.; Finn, C.E.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. (2002) Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 519-525.
163. Može, Š.; Polak, T.; Gašperlin, L.; Koron, D.; Vanzo, A.; Poklar Ulrih, N.; Abram, V. (2011) Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 6998-7004.
164. Nair, A.R.; Mariappan, N.; Stull, A.J.; Francis, J. (2017) Blueberry supplementation attenuates oxidative stress within monocytes and modulates immune cell levels in adults with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Food & Function*, **8**, 4118-28.
165. Neveu, V.; Pérez-Jiménez, J.; Vos F.; Crespy V.; du Chaffaut L.; Mennen L.; Knox C.; Eisner R.; Cruz J.; Wishart D.; Scalbert A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, **2010**, bap026.

166. Niedzwiecki, A.; Roomi, M.W.; Kalinovsky, T.; Rath, M. (2016) Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*, **8**, 552.
167. Noci, F.; Reiner, J.; Walkling-Ribeiro, M.; Cronin, D.A.; Morgan, D.J.; Lyng, J.G. (2008) Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (P, EF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple Juice. *Journal of Food Engineering*, **85**, 141-146.
168. O'Donnell, C.P.; Tiwari, B.K.; Bourke, P.; Cullen, P.J. (2010) Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 358-367.
169. Orphanides, A.; Goulas, V.; Gekas, V. (2013) Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech Journal of Food Sciences*, **31**, 509-513.
170. Patras, A.; Brunton, N.P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B.K. (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 3-11.
171. Peixoto, F.M.; Senna Gouvêa, A.-C.M.; Pessanha de Araújo Santiago, M.C.; de Sá Velosos Martins, Z.E.; Galhardo Borguini, R.; de Oliveira Godoy, R.L. (2018) Characterization and bioaccessibility of anthocyanins from blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) after simulated gastro-intestinal digestion: A positive effect on malvidin derivatives. *Fruits*, **73**, 101-109.
172. Pérez-Gregorio, M. R.; Regueiro, J.; González-Barreiro, C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. (2011) Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*, **22**, 1108-1113.
173. Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. (2011) Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **93**, 1220-1228.
174. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. (2010) Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, **64**, S112-S120.
175. Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. (2002) *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins, and Vitamin C. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **50**, 2308-2312.

176. Perrett, S.; Golding, M.; Williams, W.P. (1991) A Simple Method for the Preparation of Liposomes for Pharmaceutical Applications: Characterization of the Liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **43**, 154-161.
177. Podsedek, A.; Redzynia, M.; Klewicka, E.; Koziolkiewicz, M. (2014) Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. *BioMed Research International*, **2014**, Article ID 365738.
178. Poljuha, D.; Šola, I.; Bilić, J.; Dudaš, S.; Bilušić, T.; Markić, J.; Rusak, G. (2015) Phenolic composition, antioxidant capacity, energy content and gastrointestinal stability of Croatian wild edible plants. *European Food Research and Technology*, **241**, 573-585.
179. Pravilović, R.N.; Radunović, V.S.; Bošković-Vragolović, N.M; Bugarski, B.M.; Pjanović, R.V. (2015) The influence of membrane composition on the release of polyphenols from liposomes. *Hemijska Industrija*, **69**, 347-353.
180. 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**, 4290-4302.
181. Quan, W.; Tao, Y.; Lu, M.; Yuan, B.; Chen, J.; Zeng, M.; Qin, F.; Guo, F.; He, Z. (2018) Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro*-simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, **53**, 1131-1139.
182. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2013) Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, **68**, 125–131.
183. Rashidinejad, A.; Birch, E.J.; Sun-Waterhouse, D.; Everett, D.W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, **156**, 176-183.
184. Rey, L.; May, J.C. (2010) Glimpses into the realm of freeze-drying: Classical issues and new ventures. U: *Freeze Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 3. izdanje, Rey, L.; May, J.C. (ured.) Informa, London, UK, 1-28.
185. Remberg, S. F.; Måge, F.; Haffner, K.; Blomhoff, R. (2007) Highbush blueberries Vaccinium corymbosum L., raspberries Rubus idaeus L. and black currants Ribes nigrum L. - Influence of cultivar on antioxidant activity and other quality parameters. *Acta Horticulturae*, **744**, 259-266.
186. Režek Jambrak, A.; Lelas, V.; Mason, T.J.; Krešić, G.; Badanjak, M (2009) Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, **93**, 386-393.

187. Režek Jambrak, A.; Lelas, V.; Herceg, Z.; Badanjak, M.; Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kemija u Industriji*, **59**, 169-177.
188. Režek Jambrak, A.; Vukušić, T. (2016) State of the Art of the Use of Ultrasound in the Beverage Industry (I): Effects on Beverages, U: *Application of Ultrasound in the Beverage Industry*, Martin, J.F.G (ured.) Nova Science Publisher, New York, SAD, 1-18.
189. Režek Jambrak, A.; Vukušić, T.; Herceg, Z. (2016) State of the Art of the Use of Ultrasound in the Beverage Industry (I): Effects on Microorganisms, U: *Application of Ultrasound in the Beverage Industry*, Martin, J.F.G (ured.) Nova Science Publisher, New York, SAD, 19-32.
190. Režek Jambrak, A.; Šimunek, M.; Zeko, A; Herceg, Z.; Vukušić, T. (2017) Antioxidant, quality and electronic tongue sensory parameters of thermosonicated blueberry nectar. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **44**, 202-211.
191. Režek Jambrak, A.; Donsi, F.; Paniwnyk, L.; Djekic, I. (2019) Impact of Novel Nonthermal Processing on Food Quality: Sustainability, Modelling, and Negative Aspects. *Journal of Food Quality*, **2019**, Article ID 2171375.
192. Riaz, M.; Zia-Ul-Haq, M.; Saad, B. (2016) Occurrence of Anthocyanins in Plants, U: *Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects*, Hartel, R.W. (ured.) Springer International Publishing, Cham, Švicarska, 35-42.
193. Rios, L.Y.; Bennett, R.N.; Lazarus, S.A.; Rémésy, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 1106-10.
194. Rodriguez-Mateos, A.; Cifuentes-Gomez, T.; Tabatabaee, S.; Lecras, C.; Spencer, J.P.E. (2011) Procyanidin, anthocyanin and chlorogenic acid content of highbush and lowbush blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 5772-5778.
195. Rodriguez-Mateos, A.; Vauzour, D.; Krueger, C.G.; Shanmuhanayagam, D.; Reed, J. Calani, L.; Mena, P.; Del Rio, D.; Crozier, A. (2014) Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, **88**, 1803-1853.
196. Rodríguez-Roque, M.J.; de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.,; Cano, M.P.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. (2015) Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, **14**, 33-43.

197. Roopchand, D.E.; Kuhn, P.; Rojo, L.E.; Lila, M.A.; Raskin, I. (2013) Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacological Research*, **68**, 59-67.
198. Rossi, M.; Giussani, E.; Morelli, R.; Lo Scalzo, R.; Nanic, R.C.; Torreggiani, D. (2003) Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, **36**, 999-1005.
199. Rothwell, J.A.; Medina-Remón, A.; Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Knaze, V.; Slimani, N.; Scalbert, A. (2015) Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer dana. *Molecular Nutrition and Food Research*, **59**, 160-170.
200. Ryan, L.; Prescott, S.L. (2010) Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**, 1191-1197.
201. Sablani, S.S.; Andrews, P.K.; Davies, N.M.; Walters, T.; Saez, H.; Bastarrachea, L. (2011) Effects of air and freeze drying on phytochemical content of conventional and organic berries. *Drying Technology*, **29**, 205-216.
202. Saborowski, R.; Sahling, G.; Navarette del Toro, M.A.; Walter, I.; Garc, F.L.; García-Carreño, F.L. (2004) Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer Pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **30**, 109-118.
203. Sarriá, B.; Martínez-López, S.; Sierra-Cinos, J.L.; Garcia-Diz, L.; Goya, L.; Mateos, R.; Bravo, L. (2015) Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans. *Food Chemistry*, 174, 214-218.
204. Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goni, I. (2007) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, **101**, 492-501.
205. Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. (2006a) Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells *In Vitro*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **54**, 9329-9339.
206. Seeram, N.P. (2006b) Berries. U: Nutritional Oncology, 2.izdanje, Heber, D. i sur. (ured.) Academic Press: London, UK, 615-625.
207. Sensoy, I. (2014) A Review on the Relationship Between Food Structure, Processing and Bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54**, 902-9.

208. Sengul, H.; Surek, E.; Nilufer-Erdil, D. (2014) Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in-vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, **62**, 1069-1079.
209. Shofian, N.M.; Hamid, A.A.; Osman, A.; Saari, N.; Anwar, F.; Dek, M.S.P.; Hairuddin, M.R. (2011) Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 4678-4692.
210. Siddiq, M.; Dolan, K.D. (2017) Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, **218**, 216-220.
211. Singleton, V.L.; Rossi, J.A.J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
212. Siracusa, L.; Kulišić-Bilušić, T.; Politeo, O.; Krause, I.; Dejanovic, B.; Ruberto, G. (2011) Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 12453-12459.
213. Slatnar, A.; Jakopic, J.; Stampar, F.; Veberic, R.; Jamnik, P. (2012) The Effect of Bioactive Compounds on *In Vitro* and *In Vivo* Antioxidant Activity of Different Berry Juices. *PLoS ONE*, **7**, e47880.
214. Slomkowski, S.; Alemán, J.V.; Gilbert, R.G.; Hess, M.; Horie, K.; Jones, R.G.; Kubisa, P.; Meisel, I.; Mormann, W.; Penczek, S.; Stepto, R.F.T. (2011) Terminology of polymers and polymerization processesin dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry*, **83**, 2229-59.
215. Stanisavljević, N.; Samardžić, J.; Janković, T.; Šavikin, K.; Mojsin, M.; Topalović, V.; Stevanović, M. (2015) Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry*, **175**, 516-522.
216. Struck, S.; Plaza, M.; Turner, C.; Rohm, H. (2016) Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*, **51**, 1305-1318.

217. Stull, A.J.; Cash, K.C.; Johnson, W.D.; Champagne, C.M.; Cefalu, W.T. (2010) Bioactives in Blueberries Improve Insulin Sensitivity in Obese, Insulin-Resistant Men and Women. *Journal of Nutrition*, **140**, 1764-1768.
218. Sulaiman, A.; Farid, M.; Silva, F.V.M. (2017) Strawberry puree processed by thermal, high pressure, or power ultrasound: Process energy requirements and quality modeling during storage. *Food Science and Technology International*, **23**, 293-309.
219. Šimunić, V.; Kovač, S.; Gašo-Sokač, D.; Pfannhauser, W.; Murković, M. (2005) Determination of anthocyanins in four Croatian cultivars of sour cherries (Prunus cerasus). *European Food Research and Technology*, **220**, 575-578.
220. Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Bertolini, D.; Conte, A. (2010) *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, **120**, 599-606.
221. Taha, E.; Abouelhawa, S.; El-Geddawy, M.; Sorour, M.; Aladedunye, F.; Matthäus, B. (2014) Stabilization of refined rapeseed oil during deep-fat frying by selected herbs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 771-779.
222. Takahashi, M.; Uechi, S.; Takara, K,.; Asikin, Y.; Wada, K. (2009) Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 9141-9146.
223. Tan, J.J.Y.; Lim, Y.Y.; Siow, L.F.; Tan, J.B.L. (2015) Effects of Drying on Polyphenol Oxidase and Antioxidant Activity of Morus alba Leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, **39**, 2811–2819.
224. Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Sroka, P.; Satora, P.; Michalik, J. (2009) Transformations of Phenolic Compounds in an *in vitro* Model Simulating the Human Alimentary Tract. *Food Technology and Biotechnology*, **47**, 456-463.
225. Taruscio, T.G.; Barney, D.L.; Exon, J. (2004) Content and Profile of Flavanoid and Phenolic Acid Compounds in Conjunction with the Antioxidant Capacity for a Variety of Northwest Vaccinium Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 3169-3176.
226. Talcott, S.T. (2007) Chemical composition of berry fruits. U: *Berry fruit: value-added products for health promotion*, Zhao, Y. (ured.) CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 51-72.
227. Terefe, N.S.; Yang, Y.H.; Knoerzer, K.; Buckow, R.; Versteeg, C. (2010) High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**, 52-60.

228. Terefe, N.S.; Kleintschek, T.; Gamage, T.; Fanning, K.J.; Netzel, G.; Versteeg, C.; Netzel, M. (2013) Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **19**, 57-65.
229. Terefe, N.S.; Delon, A.; Buckow, R.; Versteeg, C. (2015) Blueberry polyphenol oxidase: Characterization and the kinetics of thermal and high pressure activation and inactivation. *Food Chemistry*, **188**, 193-200.
230. Terefe, N.S.; Sikes, A.L.; Juliano, P. (2016) Ultrasound for Structural Modification of Food Products. U: *Innovative Food Processing Technologies*, Knoerzer i sur. (ured.) Woodhead Publishing: Sawston, UK, 209-230.
231. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 669-675.
232. Tiveron, A.P.; Melo, P.S.; Bergamaschi, K.B.; Vieira, T.M.F.S.; Regitano-d'Arce, M.A.B.; Alencar, S.M. (2012) Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 8943-8957.
233. Tiwari, B.K.; Patras, A.; Brunton, N.; Cullen, P.J.; O'Donnell, C.P. (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, **17**, 598-604.
234. Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P.; Patras, A.; Cullen, P.J. (2008) Anthocyanin and Ascorbic Acid Degradation in Sonicated Strawberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 10071-10077.
235. Tomé-Carneiro, J.; Visioli, F. (2016) Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, **23**, 1145-74.
236. Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C. (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 853-876.
237. Torchilin, V.P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**, 145-160.
238. Tresserra-Rimbau, A.; Rimm, E.B.; Medina-Remón, A.; Martínez-González, M.A.; de la Torre, R.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-Gracia, E.; Lapetra, J.; Arós, A.; Fiol,

M.; Ros, E.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Saez, G.T.; Basora, J.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Vinyoles, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. (2014a) Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **24**, 639-647.

239. Tresserra-Rimbau, A.; Rimm, E.B.; Medina-Remón, A.; Martínez-González, M.A.; López-Sabater, M.C.; Covas, M.I.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-Gracia, E.; Lapetra, J.; Arós, A.; Fiol, M.; Ros, E.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Muñoz, M.M.; Gea, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. (2014b) Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC medicine*, **12**, 77.
240. Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
241. USDA (United States Department of Agriculture) (2015) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Dostupno na: https://ndb.nal.usda.gov/ndb/. Pristupljeno: 1. prosinca 2017.
242. Valadez-Carmona, L.; Plazola-Jacinto, C.P.; Hernández-Ortega, M.; Hernández-Navarro, M.D.; Villarreal, F.; Necoechea-Mondragón, H.; Ortiz-Moreno, A.; Ceballos-Reyes, G. (2017) Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **41**, 378-386.
243. Velderrain-Rodríguez, G.; Quirós-Sauceda, A.; Mercado-Mercado, G.; Ayala-Zavala, J.F.; Astiazarán-García, H.; Robles-Sánchez, R.M.; Wall-Medrano, A.; Sayago-Ayerdi, S.; Gonzáles-Aguilar, G.A. (2016) Effect of dietary fiber on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an in vitro digestion model. *Food Science and Technology*, **36**, 188-194.
244. Vilkhu, K.; Mawson, R.; Simons, L.; Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **9**, 161-169.
245. Volden, J.; Borge, G.I.A.; Bengtsson, G.B.; Hansen, M.; Thygesen, I.E.; Wicklund, T. (2008) Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). *Food Chemistry*, **109**, 595-605.

246. Wang, G.; Wang, J.J.; Yang, G.Y.; Du, S.M.; Zeng, N.; Li, D.S.; Li, R.M.; Chen, J.Y.; Feng, J.B.; Yuan, S.H.; Ye, F. (2012) Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 271-280.

247. Wang, S.Y.; Chen, C.T.; Sciarappa, W.; Wang, C.Y.; Camp, M.J. (2008) Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5788-5794.

248. Wang, S.Y. (2007) Antioxidant capacity and phenolic content of berry fruits as affected by genotype, preharvest conditions, maturity, and postharvest handling. U: *Berry fruit: value-added products for health promotion*, Zhao, Y. (ured.) CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 147-186.

249. Wang, E.; Liu, Y.; Xu, C.; Liu, J. (2017) Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. *Food & Nutrition Research*, **61**, 1325308.

250. Wechtersbach, L.; Poklar Ulrih, N.; Cigic, B. (2012) Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT: Food Science and Technology*, **45**, 43-49.

251. Wei, L., Zhang, Y., 2008. The antioxidation effect of *Pyracantha fortuneana* polyphenol *in vitro*. *Science & Technology of Food Industry*, **29**, 121-123.

252. WHO (World Health Organizaton) (2018a) Cancer. Dostupno na: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Pristupljeno: 14. siječnja 2019.

253. WHO (World Health Organizaton) (2018b) Breast Cancer. Dostupno na: https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/. Pristupljeno: 14. siječnja 2019.

254. Wojdyło, A.; Figiel, A.; Oszmianski, J. (2009) Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **57**, 1337-1343.

255. Wolfe, K.L.; Kang, X.; He, X.; Dong, M. (2008) Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **56**, 8418-8426.

256. Wong, E.; Vaillant, F.; Pérez, A. (2010) Osmosonication of Blackberry Juice: Impact on Selected Pathogens, Spoilage Microorganisms, and Main Quality Parameters. *Journal of Food Science*, **75**, 468-474.

257. Wootton-Beard, P.C; Moran, A.; Ryan, L. (2011) Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, **44**, 217-224.

258. Wu, R.; Frei, B.; Kennedy, J.A.; Zhao, Y. (2010) Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries. *LWT - Food Science and Technology*, **43**, 1253-1264.

259. Xiao, Y.; Chen, X.; Yang, L.; Zhu, X.; Zou, L.; Meng, F.; Ping, Q. (2013) Preparation and Oral Bioavailability Study of Curcuminoid-Loaded Microemulsion. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **61**, 3654-3660.

260. Xu, S.; Ni, Z.; Ma, L.; Zheng, X. (2017) Control of alternaria rot of cherry tomatoes by food-grade *Laurus nobilis* essential oil microemulsion. *Journal of Food Safety*, **37**, e12286.

261. Yan, X.; Xu, W.; Chen, L.; Shao, R. (2018) Food-grade Water in Oil Microemulsion as a Potential Approach for Tea Polyphenols Encapsulation. *Tenside Surfactants Detergents*, **55**, 103-109.

262. Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.M. (2001) Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**, 752-767.

263. Yen, G.-C.; Duh, P.-D. (1994) Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **42**, 629-632.

264. Yilmaz, Y.; Toledo, R. (2005) Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*, **93**, 273-278.

265. Zamora-Ros, R.; Jimenez, C.; Cleries, R.; Agudo, A.; Sanchez, M.-J.; Sanchez-Cantalejo, E.; Molina-Montes, E.; Navarro, C.; Chirlaque, M.-D.; Huerta, J. M.; Amiano, P.; Redondo, M. L.; Barricarte, A.; González, C.A. (2013) Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in a Spanish cohort. *Epidemiology*, **24**, 726-733.

266. Zhu, J.; Wang, Y.; Li, X.; Li, B.; Liu, S.; Chang, N.; Jie, D.; Ning, C.; Gao, H.; Meng. (2017) Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on Escherichia coli O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, **37**, 251-259.

267. Zorić, Z.; Dragović-Uzelac, V.; Pedisić, S.; Kurtanjek, Ž.; Elez Garofulić, I. (2014) Kinetics of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols Degradation During Heat

Treatments of Freeze-dried Sour Cherry Marasca Paste, *Journal of Food Technology and Biotech*nology, **52**, 101-108.

268. Zorić, Z.; Markić, J.; Pedisić, S.; Bučević-Popović, V.; Generalic-Mekinić, I.; Grebenar, K.; Kulišić-Bilušic, T. (2016) Stability of rosmarinic acid in aqueous extracts from different lamiaceae species after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. *Food Technology and Biotechnology*, **54**, 97-102.

Životopis

Nikolina Liović, mag. nutr., rođena je 14. ožujka 1987. u Rijeci gdje je završila osnovnu i srednju medicinsku školu. Na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu u Zagrebu diplomirala je 2011. godine te stekla akademski naslov magistra nutricionizma.

Od rujna 2012. godine zaposlena je u suradničkom zvanju asistenta na Fakultetu za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu u Opatiji, na Katedri za hranu i prehranu. U travnju 2014. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij Nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao istraživač sudjelovala je na znanstveno-istraživačkom bilateralnom projektu „Nutricionistički i sigurnosni aspekti hrane kao element unaprjeđenja turističke i ugostiteljske djelatnosti“ tijekom 2017. i 2018. godine, od 2017. godine sudjeluje na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Greenvotlex – Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja“, a od 2019. godine na europskom projektu „AdriaAquaNet – *Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture“.*

Rezultati njenog istraživanja prezentirani su na 7 međunarodnih i 2 domaća znanstveno-stručna skupa te na radionici za doktorande „*European PhD Workshop on Food Engineering and Technology*“ u Freising-Weihenstephan, Njemačka, u travnju 2018. godine.

Popis objavljenih radova

Liović, N.; Bošković, P.; Drvenica, I.; Režek Jambrak, A.; Dropulić, A.M.; Krešić, G.; Nedović, V.; Bugarski, B.; Zorić, Z.; Pedisić, S.; Bilušić, T. (2019) Phenolic Extracts from *Vaccinium corymbosum* L. Loaded in Microemulsions and Liposomes as Enhancers of Olive Oil Oxidative Stability. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences,* 69 (1), 23-33.

Krešić, G.; Liović N.; Pleadin, J. (2019) Effects of menu labelling on students´ food choice: a preliminary study, *British Food Journal,* 121 (2), 479-491.

Krešić, G.; Kenđel Jovanović, G.; Pavičić Žeželj, S.; Pleadin, J.; Liović, N., Plepel K. (2018) Parental adherence to Mediterranean diet is associated with their adolescents´ cereals intake. *Croatian Journal of Food Science and Technology,* 10 (1), 81-88.

Krešić, G.; Pleadin, J.; Liović, N.; Kučan, P.; Vujačić, V.; Šušnić, S. (2018) Gender- specific differences in perception of menu labelling, witnessed among Hospitality Management students. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 13 (1-2), 4-11.

Mrduljaš, N.; Krešić, G.; Bilušić, T. (2017) Polyphenols: Food Sources and Health Benefits. U: *Functional Food – Improve Health through Adequate Food*, Chávarri Hueda, M. (ured.) IntechOpen, Rijeka, Hrvatska, 23-41.

Krešić, G.; Mrduljaš, N. (2016) The relationship between knowledge and use of nutrition information on food package, *Acta Alimentaria*, 45(1), 36-44.

Krešić, G.; Dujmović, M.; Mrduljaš, N. (2016) Inadequate water intake of breastfeeding women, *Progress in nutrition*, 18, 266-275.

Šušnić, S.; Mrduljaš, N.; Krešić, G.; Gadanec, M. (2014) Features and characteristics of IFS Food standard implementation in the milling industry. 7th International Congress Flour-Bread 2013, Book of Proceedings, 279-291.

Krešić, G.; Mrduljaš, N.; Kenđel Jovanović, G.; Pavičić Žeželj, S.; Štiglić, P. (2014): Use of nutrition label as a weight control behaviour? 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Book of Proceedings, 179-184.

Krešić, G.; Dujmović, M.; Mandić, M.L.; Mrduljaš, N. (2013) Majčino mlijeko: sastav masnih kiselina i prehrana dojilja, *Mljekarstvo*, 63, 158-171.

Panjkota Krbavčić, I.; Colić Barić, I.; Sučić, M.; Hruškar, M.; Marković, K.; Zechner Krpan, V.; Mrduljaš, N. (2011) Dietetic research of infant nutrition and protein efficiency ratio for some infant formulas from Croatian market, *Mljekarstvo*, 59, 289-295.