

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva koprive

Rašić, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:985690>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva koprive

DIPLOMSKI RAD

Anamaria Rašić

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

HORTIKULTURA-POVRĆARSTVO

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva koprive

DIPLOMSKI RAD

Anamaria Rašić

Mentor:

Doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREB
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anamaria Rašić**, JMBAG 017812151 , rođena 11.7.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva koprive

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Anamaria Rašić**, JMBAG 017812151, naslova

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva koprive

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Doc.dr.sc Jana Šic Žlabur mentor

2. Prof.dr.sc Sandra Voća član

3. Doc.dr.sc Sanja Radman član

Zahvala

Od srca se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jani Šic Žlabur na pomoći, strpljenju, sugestijama te prijateljskim savjetima prilikom izrade rada. Zahvaljujem se tehničkoj suradnici Martini Krilčić na pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada. Hvala mojim prijateljicama koje su svojim prisustvom uljepšale moje studentske dane. Na kraju, jedno veliko hvala mojoj obitelji i mom Robertu na bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Cilj rada	2
2. Pregled literature.....	2
2.1. Morfološka i biološka svojstva koprive	2
2.2. Fitokemijski sastav koprive	4
2.3. Fenolni spojevi	4
2.4. Pigmenti	5
2.5. Vitamin C.....	6
2.6. Ostali spojevi u koprivi.....	6
2.6.1. Uporaba koprive i alkoholnih ekstrakata koprive (tinktura)	7
2.7. Ultrazvučna ekstrakcija.....	7
3. Materijali i metode	10
3.1. Materijali rada	10
3.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara	13
3.2.1. Određivanje gustoće otopine	13
3.2.2. Određivanje električne provodljivosti	13
3.2.3. Određivanje ukupne kiselosti	13
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti	14
3.2.5. Određivanje boje ekstrakata CIELAB metodom	15
3.3. Metode određivanja specijaliziranih metabolita i antioksidacijskog kapaciteta	16
3.3.1. Određivanje sadržaja vitamina C	16
3.3.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	17
3.3.3. Određivanje flavonoida i neflavonoida	20
3.3.4. Određivanje klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila	21
3.3.5. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta.....	22
3.4. Statistička obrada podataka	24
4. Rezultati i rasprava	25
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva alkoholnih ekstrakata koprive	25
4.1.1. Gustoća uzoraka.....	25

4.1.2.	Električna provodljivost	26
4.1.3.	Sadržaj ukupnih kiselina	27
4.1.4.	pH vrijednost	28
4.1.5.	Kromatski parametri ekstrakata koprive	29
4.2.	Specijalizirani metaboliti i antioksidacijski kapacitet	33
4.2.1.	Sadržaj vitamina C	33
4.2.2.	Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida	34
4.2.3.	Sadržaj pigmentnih spojeva alkoholnih ekstrakata koprive	37
4.2.4.	Antioksidacijski kapacitet	41
5.	Zaključak.....	43
6.	Literatura	45
	Životopis	49

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anamaria Rašić**, naslova

ULTRAZVUČNO POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA KOPRIVE

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja vrsta koja pripada porodici koprivnjača (Urticaceae). Stoljećima se koristi kao funkcionalna namirnica te također pronalazi svoju primjenu u medicini, farmaciji, kozmetici te tekstilnoj industriji. Kopriva je biljna vrsta bogatog i složenog kemijskog sastava zbog čega je još uvijek predmet raznih istraživanja. Cilj ovog rada bio je utvrditi sadržaj bioaktivnih spojeva te odrediti nutritivni potencijal alkoholnih ekstrakata suhog lista koprive s obzirom na metodu i duljinu trajanja ultrazvučno potpomognute ekstrakcije. Alkoholni ekstrakti pripremljeni su iz praha suhog lista koprive (2 g) uz 50%-tni etilni alkohol (150 mL) kao otapalo. Pripremljene otopine tretirane su ultrazvukom visokog intenziteta prilikom čega je variran tip uređaja (sonda i kupelj) te vrijeme tretmana (5, 10, 15 i 30 min). Istraživanjem su određeni sljedeći fizikalno-kemijski parametri otopina: gustoća, električna provodljivost, sadržaj ukupnih kiselina, pH vrijednost te boja; dok je od specijaliziranih metabolita određen sadržaj: vitamina C, ukupnih fenola (flavonoida i neflavonoida), ukupnih klorofila, ukupnih karotenoida te antioksidacijski kapacitet. Najviše vrijednosti vitamina C, fenola, neflavonoida, ukupnih klorofila i karotenoida te antioksidacijskog kapaciteta zabilježene su u uzorku tretiranom ultrazvučnom sondom u vremenskom razdoblju od 15 minuta. Iz prethodno navedenog, može se zaključiti kako je tretman ultrazvučnom sondom iznimno učinkovit u izolaciji bioaktivnih spojeva u vrlo kratkom vremenu. Također, analizom alkoholnih ekstrakata koprive može se utvrditi kako se radi o nutritivno vrijednom proizvodu s brojnim potencijalnim funkcionalnim svojstvima.

Ključne riječi: kopriva, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija, ultrazvučna sonda, ultrazvučna kupelj

Summary

Of the master's thesis – student **Anamaria Rašić**, entitled

ULTRASONICALLY ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM STINGING NETTLE

Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is a perennial species of the nettle family (Urticaceae). It has been used for centuries as a functional food and is also used in medicine, pharmacy, cosmetics, and the textile industry. Stinging nettle is a plant species with a rich and complex chemical composition, which is why it is still the subject of various research. The aim of this study was to determine the content of bioactive compounds and to determine the nutritional potential of alcoholic extracts from dried nettle leaves with respect to the method and duration of ultrasound-assisted extraction. Alcoholic extracts were prepared from dried nettle leaf powder (2 g) using 50% ethyl alcohol (150 mL) as solvent. The prepared solutions were treated with high intensity ultrasound, varying the type of device (probe and bath) and the duration of treatment (5, 10, 15 and 30 min). The following physico-chemical parameters of the solutions were determined by the study: density, electrical conductivity, total acids content, pH and color; while the content of specialized metabolites is determined by: vitamin C, total phenols (flavonoids and non-flavonoids), total chlorophylls, total carotenoids and antioxidant capacity. The highest values of vitamin C, phenolics, non-flavonoids, total chlorophylls and carotenoids, and antioxidant capacity were determined in the sample treated with ultrasonic probe for a period of 15 minutes. It can be concluded that ultrasonic probe treatment is extremely effective in isolating bioactive compounds in a very short time. Moreover, the analysis of the alcoholic extracts of nettle can show that it is a nutritionally valuable product with many potential functional properties.

Keywords: nettle, ultrasonically assisted extraction, ultrasound probe, ultrasound bath

1. Uvod

Kopriva je još od davnina upotrebljavana kao važna ljekovita i prehrambena biljna vrsta (Glavaš, 2019). Višegodišnja je i jestiva, a pripada porodici Urticaceae (koprivnjače). Široko je rasprostranjena po cijelom svijetu gdje raste samoniklo, najčešće u gustim skupinama. Ime roda *Urtica* dolazi od latinske riječi „uro“ što znači „peći“ (Gelenčir i Gelenčir, 1991). Koristi se u medicini, farmaciji, kozmetici, tekstilnoj industriji, u proizvodnji papira, boja i lakova. Upotrebljava se kod raznih bolesti, a najčešći problemi kod kojih se savjetuje njena primjena su slabokrvnost, probavne smetnje, kao diuretik, za čišćenje krvi, protiv kašlja, protiv krvarenja te u saniranju rana i čireva. Listovi koprive sadrže brojne fitokemikalije od klorofila (a i b), vitamina (C, K, B), karotenoida, mineralnih tvari (željezo, mangan, bakar, magnezij, natrij), polifenola, terpena, sterola, eteričnog ulja, neke alkaloida, acetilkolin i histamin (Glavaš, 2019).

Kako se danas sve više ljudi okreće zdravom načinu života tako brojni proizvodi na prirodnoj bazi postaju sve traženiji i popularniji. Primjer jednog takvog proizvoda je upravo tinktura. Tinktura je alkoholno-vodeni ekstrakt određene ljekovite biljke, a koji ima jače i koncentriranije djelovanje (Carović-Stanko i Vidak, 2021). Tinktura koprive bogatog je nutritivnog sastava zbog visokog sadržaja vitamina, minerala i fitokemikalija kao što su polifenoli, klorofili i karotenoidi, zbog čega posjeduje značajna antioksidacijska svojstva i pozitivan utjecaj na organizam. Priprema tinktura je kemijski zahtjevan proces koji se najčešće provodi konvencionalnim tehnikama, no sve češće se u pripremi uvode neinvazivne tehnike koje imaju brojne prednosti. Jedna od takvih tehnika je i uporaba ultrazvuka visokog intenziteta (Šic Žlabur i sur., 2021).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta novija je i sve istraživanja metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Uporaba ultrazvuka visokog intenziteta omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem vremenskom razdoblju, jednostavnije rukovanje, niže temperature tijekom procesiranja te korištenje manjih količina otapala (Drmić i Režek Jambrak 2010). Važno je naglasiti još jednu značajnu prednost upotrebe ultrazvuka, a to je očuvanje nutritivne kvalitete proizvoda s obzirom kako brojna istraživanja dokazuju očuvanje sadržaja bioaktivnih spojeva tijekom primjene ultrazvuka (Šic Žlabur i sur., 2021).

1.1 Cilj rada

Utvrđiti sadržaj bioaktivnih spojeva i nutritivni potencijal alkoholnih ekstrakata suhog lista koprive s obzirom na metodu i duljinu trajanja ultrazvučno potpomognute ekstrakcije.

2. Pregled literature

2.1. Morfološka i biološka svojstva koprive

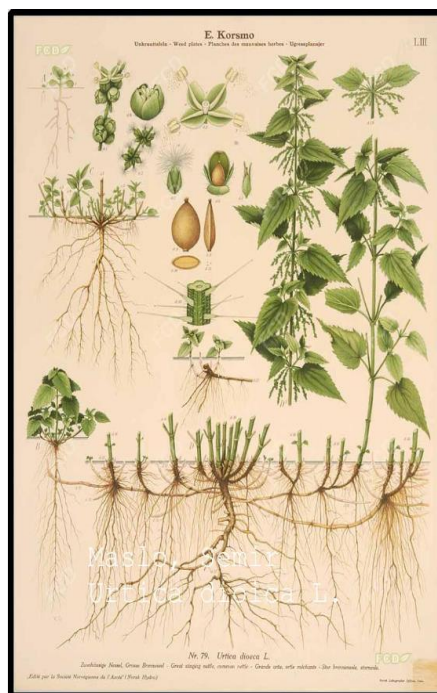
Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja, samonikla, zeljasta i dvodomna biljna vrsta (Slika 1) koja pripada rodu *Urtica*, porodici Urticaceae (koprivnjače) (Radman, 2015). U narodu je poznata i pod nazivima tariga, tarulja, tegavica, tigovica, koprva, obična kopriva, pasja kopriva, pasja kupina i pitoma kopriva. Zbog svoje prilagodljivosti je vrlo poznata i rasprostranjena biljna vrsta u umjerenom i u tropskom području Europe, Azije i Amerike (Radman, 2015). Ova biljka nadaleko je poznata po svojoj izuzetnoj biološkoj aktivnosti i blagotvornom učinku na zdravlje ljudi (Đurović i sur., 2017).



Slika 1. Kopriva (www.eduka.hr)

Kopriva ima dubok i razgranat korijen s mnogo postranih izbojaka. Stabljika je uspravna s kratkim bodljama i dugim dlačicama žarnicama. Dlačice žarnice mogu se pronaći i na listovima. One biljci služe kao zaštita od kukaca. Oštre iglice u dodiru s kožom otpuštaju

mravlju kiselinu, acetilkolin i histamin. Ti toksini na koži uzrokuju crvenilo, svrbež i peckanje. Stabljika je visine od 30 cm do 1,5 m. Listovi biljke koprive su uspravni, jajoliki ili lancetasti te grubo nazubljenog oboda. Cvatnja se odvija od početka proljeća do mjeseca lipnja. Cvjetovi su neugledni i zeleni. Kopriva kao dvodomna biljna vrsta ima muške i ženske cvjetove. Muški cvjetovi su uspravni dok ženski cvjetovi vise. Plod je jednosjemeni oraščić koji sazrijeva od kolovoza do studenog (Slika 2). Kopriva ima vrlo sitno sjeme smeđe boje (Radman, 2015; Glavaš, 2019). Odgovaraju joj sjenovita i vlažna područja pa se često može naći u šumama, na livadama, uz potoke i uz cestu. Zbog svog rasta i široke rasprostranjenosti smatra se korovnom vrstom. Kopriva je nitrofilna biljna vrsta kojoj je potrebna velika količina dušika. Ne odgovara joj zbijeno tlo. Za uzgoj koprive pogodni su gotovi svi tipovi tala, a naročito tla bogata humusom (Radman, 2015). Optimalna temperatura za rast i razvoj koprive je od 15 do 23 °C. Velika prednost koprive je to što kreće s rastom rano u proljeće kada je temperatura iznad 5 °C. Smatra se kako je kopriva visokih zahtjeva za vodom, iako podaci o njenoj potrebi i učinkovitosti iskorištenja vode nisu dostupni. Uzgoj koprive bez navodnjavanja moguć je uz ljetne padaline od 56 mm po mjesecu (Jurčić, 2019).



Slika 2. Morfološke karakteristike koprive (www.flora.croatica.database.hr)

Zbog njenog bogatog fitokemijskog sastava pripisuju joj se mnogobrojna ljekovita svojstva. U tradicionalnoj medicini koristi se kao diuretik, za liječenje reume i artritisa (Rafajlovska i sur., 2013). Kopriva sadrži broje biološki aktivne spojeve. List koprive bogat je

izvor terpenoida, karotenoida i masnih kiselina, kao i raznih esencijalnih aminokiselina, klorofila, vitamina, tanina, ugljikohidrata, sterola, polisaharida i minerala (Kriegel i sur., 2018). Upravo zbog navedenog, kopriva se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji, ali i u ekološkoj poljoprivredi kao gnojivo ili insekticid. Dijelovi koprive, najčešće listovi mogu poslužiti za pripremu raznih ljekovitih pripravaka kao što su tinkture, infuzi, dekokti i vodeni macerati. Infuzi neke ljekovite biljke pripremaju se prelijevanjem sušenog biljnog materijala vrelom vodom. Dekokti se pripremaju kuhanjem biljke u kipućoj vodi nekoliko minuta, a vodeni macerati se pripremaju na način da se biljni materijal potapa u mlaku vodu i ostavlja neko vrijeme (Carović-Stanko i Vidak, 2021). Osim kao lijek ili sastojak raznih kozmetičkih proizvoda (krema, šampona) kopriva se koristi i u kulinarstvu (Rafajlovska i sur., 2013; Radman, 2015).

2.2. Fitokemijski sastav koprive

Fitokemikalije ili fitotvari, odnosno fitonutrijenti ili fitohranjiva, su skupina biološki aktivnih spojeva prisutnih u biljkama. Biljke ih sintetiziraju s ciljem zaštite od abiotičkih i stresnih čimbenika. Fitokemikalije nisu esencijalne za funkcioniranje ljudskog organizma, ali njihova uloga je funkcionalna. Štite organizam od raznih oboljenja ili ih preveniraju (Radman, 2015). Kopriva sadrži značajnu količinu bioaktivnih spojeva koji imaju antioksidativno djelovanje. Ona je izvor minerala magnezija (Mg), kalcija (Ca), cinka (Zn), željeza (Fe), vitamina (A, C, riboflavin i K), proteina te bioaktivnih komponenata kao što su klorofili, karotenoidi i polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline) te fitosterola i glikozida (Radman, 2015). Na fitokemijski sastav biljke značajno utječu i brojni čimbenici, od genetskih svojstava (vrsta, genotip), klima, tlo, vremena berbe do postupaka nakon berbe i to prvenstveno načina skladištenja i prerade (Kriegel i sur., 2018).

2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti te jedna od najraznolikijih skupina fitonutrijenata rasprostranjena u većini biljaka. Broje nešto više od 8 000 različitih spojeva. U

svojoj kemijskoj građi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten. U biljnom tkivu imaju važnu fiziološku i morfološku ulogu (Radman, 2015).

Osnovna uloga biljnih fenola je izravno sudjelovanje u obrambenom mehanizmu biljke te ju štite od različitih negativnih vanjskih utjecaja, napada štetnika ili biljnih oboljenja, odnosno različitih biotskih i abiotskih čimbenika. Odgovorni su za cjelokupno organoleptičko svojstvo (boja i aroma) biljne hrane (Šic Žlabur, 2015).

Polifenoli su podijeljeni u brojne skupine, a kao najvažnije od tih ističu se flavonoidi i neflavonoidi. U skupinu flavonoida ubrajaju se flavonoli, flavanoli, flavan -3- oli, flavani, flavoni, izoflavoni, antocijanidini i čalkoni. Flavonoidi se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije aromatskog prstena. U neflavoidne spojeve ubrajaju se fenolne kiseline, lignani i stilbeni (Berend i sur., 2012; Radman, 2015).

Svježi listovi koprive sadrže skupinu flavonoida kojima pripada podskupina flavonola i to: kamferol, izoramnetin i kvercetin te njihovi 3 – glikozidi. Dok se u korijenu koprive nalaze isoramnetin, katehin, kamferol, kvercetin, miricetin, naringin i rutin (Jurković, 2019).

2.4. Pigmenti

Klorofili su pigmenti svjetlo zelene boje i glavni fotoreceptori u fotosintezi, koji se nalaze u fotosintetskim biljkama i bakterijama. Klorofili voću i povrću daju karakterističnu zelenu boju. Nalaze se u biljnim organelima koji se nazivaju kloroplasti. U skupinu klorofila ubrajamo 5 različitih vrsta, a to su klorofil a, klorofil b, klorofil c, klorofil d i klorofil e. Prva dva su najzastupljenija u biljkama, dok se ostali mogu pronaći u raznim algama (Feruzzi i Schwartz, 2001). Klorofil a glavni je fotoreceptor jer omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku energiju. Kopriva sadrži značajnu količinu klorofila. U svježim listovima ona iznosi 0,008 – 0,3%, a u osušenim listovima čak 0,6 - 1% (Jurković, 2019). Karotenoidi su skupina prirodnih pigmenata koji se sintetiziraju iz biljaka, algi i fotosintetskih bakterija. Oni su izvor žute, narančaste i crvene boje. Do sada ih je opisano preko 600 vrsta. Karotenoidi se dijele u dvije skupine: karotene (α -karoten, β -karoten, likopen) i ksantofile (β -kriptoksantin, lutein, zeaksantin). Karotenoidi također imaju značajno antioksidativno djelovanje, odnosno

sprječavaju da slobodni radikali svojim djelovanjem oštete stanicu ili je dovedu do letalnog ishoda (Petrović, 2018).

Jedni od najpoznatiji karotenoida su likopen koji daje specifičnu crvenu boju (velike koncentracije u rajčici) te beta-karoten koji biljkama daje narančastu boju (značajne koncentracije u mrkvi). Manje poznati karotenoidi, a koji pokazuju izuzetno snažno antioksidacijsko djelovanje su astaksantin i zeaksantin (Petrović, 2018). Glavni karotenoid prisutan u listovima koprive je beta-karoten (Radman, 2015).

2.5. Vitamin C

Vitamin C poznat još i pod nazivom askorbinska kiselina. Prisutan je u svježem voću i povrću te je topljiv u vodi. Ima jaku i izraženu antioksidacijsku aktivnost. Povećani unos vitamina C doprinijet će smanjenu rizika od raznih bolesti. Askorbinska kiselina dokazano ima pozitivan učinak na kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa I. Ujedno sprječava starenje stanica te ima antikancerogeno djelovanje. Vitamin C je termolabilan, odnosno povećanjem temperature njegov sadržaj se drastično smanjuje. Udio vitamina C u listovima koprive ovisi o starosti listova i metodi kojom se utvrđivala njegova količina. Prema literaturnim navodima, sadržaj vitamina C u svježim listovima koprive iznosi 36,40 mg/100 g svježe tvari u samoniklim svojstama (Radman, 2015) te 48,82 mg/100 g svježe tvari u kultiviranim biljkama (Radman i sur., 2015). Također, pojedini autori navode i sadržaj vitamina C u vodenom infuzu lista koprive u iznosu 0,03 mg/ 100 g svježe tvari (Radman, 2015).

2.6. Ostali spojevi u koprivi

U listovima koprive prisutne su masne kiseline. Esencijalne masne kiseline tijelo ne može proizvoditi samo već se one moraju unositi prehranom, a prijeko su potrebne za očuvanje ljudskog zdravlja (Radman, 2015). Rafajlovska i sur., (2001) dokazali su prisustvo 6,8% palmitinske kiseline, stearinske 1,1%, oleinske 3,6%, linolne 20,2% i 12,4% linolenske kiseline u koprivi.

2.6.1. Uporaba koprive i alkoholnih ekstrakata koprive (tinktura)

Zbog velike količine fenolnih tvari koje sadrži koristi se kod liječenja srčanih bolesti, u prevenciji visokog krvnog tlaka, karcinoma, virusnih i parazitskih oboljenja te psihičkih smetnji (Radman, 2015). Novije studije pokazuju kako su sve češće istraživanja znanstvenika usmjerena u istraživanju antikancerogenog učinka ekstrakata koprive na ljudskim organizam. Tako su na primjer, Esposito i sur., (2019) u laboratorijskim uvjetima i na eksperimentalnim životinjskim modelima ispitivali citotoksične, antitumorske i antimetastatske učinke ekstrakata koprive na nekoliko vrsta raka kod ljudi. Posebna pozornost posvećena je liječenju raka dojke koji je najčešći oblik raka među ženama i jednog od glavnih uzroka smrti u svijetu. Antikancerogeno djelovanje ekstrakata koprive pripisuje se upravo bogatom sadržaju polifenola koji posjeduju antioksidativna svojstva. Joshi i sur., (2014) u svojoj studiji osim ispitivanja utjecaja koprive na stanice raka dojke istraživali su i utjecaj na benignu hiperplaziju prostate, utjecaj na hipertenziju, alergije, artritis. Svi testovi potvrđuju blagotvorno djelovanje koprive na navedena oboljenja.

Prema Kruk i sur., (2019) ekstrakt suhog lišća koprive koristi se kao formulirani dodatak prehrani u svrhu liječenja simptoma osteoartritisa.

Kopriva se koristi i kao izvor prirodne zelene boje, odnosno kao pigment prirodnog porijekla. Ekstrakt klorofila iz koprive upotrebljava se za bojanje sapuna i šampona, kozmetičkih proizvoda, raznih losiona, pasta za zube i antibakterijskih vodica za ispiranje usta te jestivih masti (Radman, 2015). Koristi se kod rijetke i slabe kose, za njenu obnovu kao voda za pranje kose u kojoj se prokuha svježi list i/ili korijen koprive. Odlična je i kao tinktura od korijena koprive za masažu vlasišta (Carović-Stanko, 2021).

2.7. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološki postupak potpunog ili djelomičnog odvajanja i izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese. S obzirom na agregatno stanje dviju faza u nekoj smjesi, razlikujemo dva tipa ekstrakcije: tekuće-tekuće i čvrsto-tekuće. Vrijeme potrebno za

ekstrakciju ovisi o topljivosti tvari u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini tvari izloženoj otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama ubrzava procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, no previsoke temperature uzrokuju degradaciju nutritivnih svojstava ili izdvajanje nepoželjnih tvari (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Šic Žlabur, 2015). Otapala koja se najčešće koriste prilikom ekstrakcije su voda, alkohol, aceton i biljna ulja.

Primjena ultrazvuka sve je češća u tehnologijskim procesima prehrambene industrije i biotehnologije s ciljem očuvanja bioraspoloživosti mikronutrijenata, koji imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka pritom zadržavajući njihova izvorna svojstva (Drmić i Režek Jambrak 2010; Šic Žlabur, 2015). Ova novija tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti omogućuju visoku preciznost u kraćem vremenu, jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Drmić i Režek Jambrak 2010).

Razlikujemo ultrazvuk koji primjenjuje ultrazvučne valove niskog intenziteta i ultrazvučne valove visokog intenziteta. Ultrazvučni valovi niskog intenziteta imaju frekvenciju 1 do 10 MHz i vrlo malu snagu od 1 W/cm^2 . Ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji prolaze pa se upotrebljavaju za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane, u dijagnostičke svrhe ili pak za površinsko čišćenje hrane. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta podrazumijevaju frekvencije od 20 do 100 kHz i raspon snage od 10 do 1000 W/cm^2 . Zbog velike snage uzrokuje fizička oštećenja tkiva, ali i neke od kemijskih reakcija. Ultrazvuk visokog intenziteta ubrzava kemijske reakcije, dispergiranje agregata, povećava brzinu difuzije, ali i uništenje mikroorganizama i enzima (Herceg i sur., 2008).

Općenito, svaki zvučni val karakteriziraju slijedeći elementi: amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (i koeficijent atenuacije (a) koji ovisi o karakteristikama materijala za koji se ultrazvuk primjenjuje (Herceg i sur., 2008).

Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje pojavu prijelazne kavitacije. Kavitacija se javlja kada dolazi do nastajanja, rasta i naglog raspada mjehurića u otapalu koji se tretira ultrazvukom. Kavitacija na stanicu utječe na način da dolazi do pucanje stanične stijenke što potpomaže oslobađanju topljivih sastojaka iz uzorka u otapalo. Pomoću ove pojave ubrzava se ekstrakcija, ali se i povećava njena učinkovitost (Herceg i sur., 2008; Šic Žlabur 2015). Najčešći tip opreme koji se koristi za primjenu ultrazvuka u laboratorijske svrhe je sustav ultrazvučne sonde (Slika 3) i sustav ultrazvučne kupelji (Slika 4).



Slika 3. Sustav ultrazvučne sonde



Slika 4. Ultrazvučna kupelj

3. Materijali i metode

3.1. Materijali rada

Za ovo istraživanje korišten je prah svježih listova kultivirane koprive uzgojene u plutajućem hidroponskom sustavu na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za povrćarstvo. Kopriva je za uzgoj u sustavu plutajućeg hidropona (plutajući kontejneri) postavljena u svibnju 2021. godine.

Kopriva se višekratno kosila na visini 15-20 cm iznad donja dva nodija, u fazi prije cvatnje. Za potrebe pripreme praha korišteni su svježi listovi koprive iz trećeg roka košnje provedene u srpnju 2021. Odmah nakon košnje nadzemni dio biljke dostavljen je u laboratorij Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Listovi koprive odvojeni su ručno od stabljike i postavljeni na sušenje u prirodnim uvjetima. Rasprostranjeni su u jednom sloju na kartonski papir te sušeni u provjetrenom prostoru uz prosječnu temperaturu zraka prostorije od 27 °C i relativnu vlagu zraka od 73%. Listovi koprive sušeni su do prosječnog sadržaja vode u suhom materijalu od 10% , proces sušenja u prirodnim uvjetima do željenog sadržaja vode trajao je 5 dana.

Osušeni listove koprive usitnjeni su sustavom rotirajućih noževa (Zepter Mix, Švicarska) do konzistencije praha (Slika 5). Usitnjeni uzorak propušten je kroz sito veličine pora 1 mm, čime je utvrđena prosječna veličina čestica praha od 1 mm.



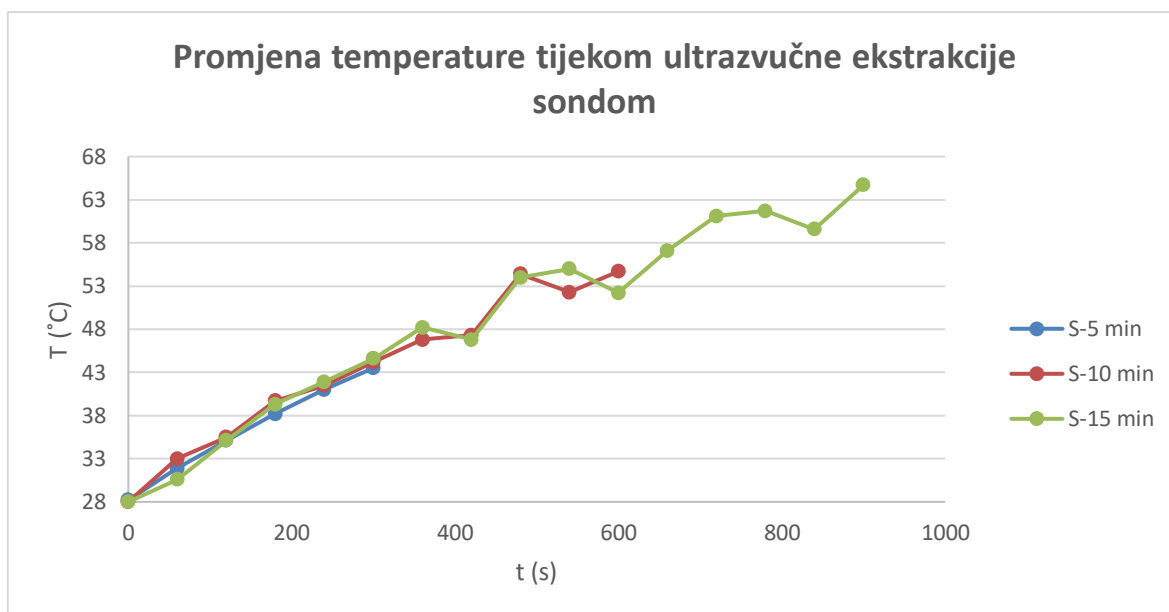
Slika 5. Prah suhog lista koprive

Prah je korišten za pripremu tinktura (alkoholnih ekstrakata) od koprive. Neovisno o načinu ekstrakcije, u laboratorijske čaše volumena od 300 mL odvagano je $2,0 \pm 0,01$ praha te dodano 130 mL 50%-og etanola (v/v). Dio uzoraka odvojen je za tretman sustavom ultrazvučne sonde (Bandelin HD 2000.2, Njemačka), dio za tretman u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin RK 103H, Njemačka), dok je klasična ekstrakcija predstavljala kontrolni uzorak (Tablica 2). Ultrazvučni tretman sondom proveden je uređajem nominalne maksimalne snage uređaja od 200 W i promjera sonde od 13 mm, a prilikom čega je varirano vrijeme tretmana i to 5, 10 i 15 min. Tretman u kupelji proveden je tako da su uzorci u čašama postavljeni u ultrazvučnu kupelj frekvencije 35 kHz i nominalne maksimalne snage uređaja od 140 W, a prilikom čega je varirano vrijeme tretmana od 10, 15 i 30 min. Klasična ekstrakcija provedena je tako da su pripremljeni uzorci ostavljeni stajati na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje tijekom 24 h. Nakon svakog tretmana uzorci su profiltrirani preko Whatmanovog filter papira kako bi se odvojila kruta faza i dobio tekući ekstrakt koprive. U uzorcima tretiranih ultrazvukom (i sustavom sonde i kupelji) svakih 60 sekundi mjerena je temperatura uzoraka kako bi se pratila promjena iste tijekom ultrazvučnog tretmana, a što je prikazano u Grafikonima 1 i 2.

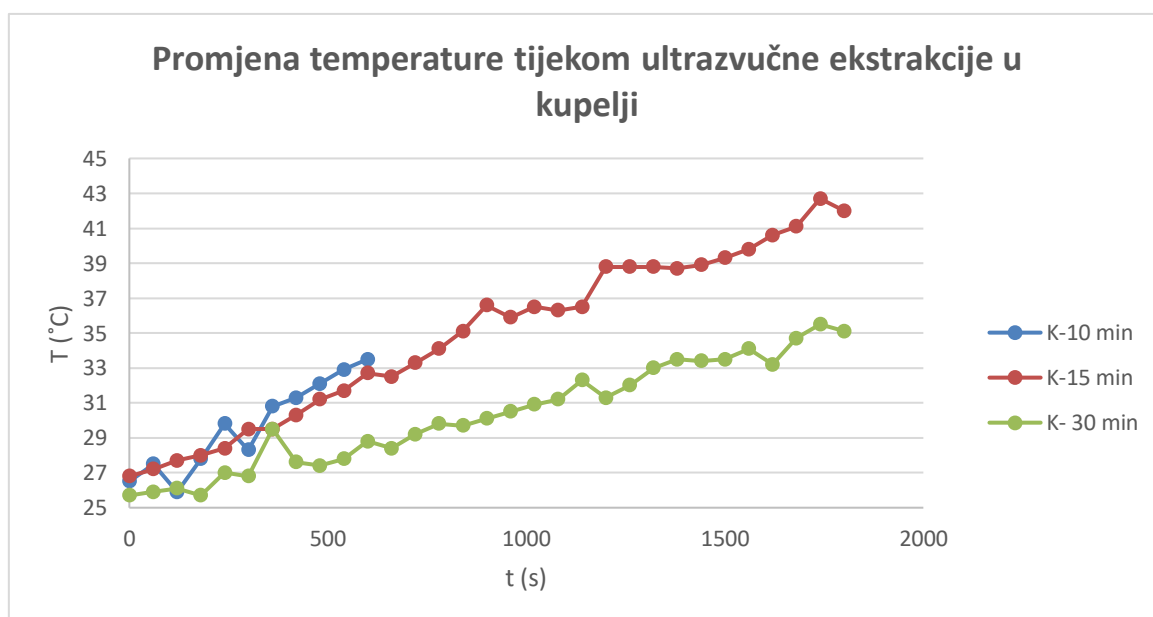
Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije praha koprive

Način ekstrakcije	Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	Uzorak
UZV SONDA	EtOH, 50%	130	5	200	S-5
UZV SONDA	EtOH, 50%	130	10	200	S-10
UZV SONDA	EtOH, 50%	130	15	200	S-15
UZV KUPELJ	EtOH, 50%	130	10	140	K-10
UZV KUPELJ	EtOH, 50%	130	15	140	K-15
UZV KUPELJ	EtOH, 50%	130	30	140	K-30
KLASIČNO	EtOH, 50%	130	1440	-	Kontr-24

UZV SONDA- ultrazvučni tretman sondom; UZV KUPELJ- ultrazvučni tretman u kupelji; EtOH- etanolni alkohol.



Grafikon 1. Promjena temperature ($^{\circ}\text{C}$) alkoholnih ekstrakata koprive tijekom ultrazvučnog tretmana sondom u različitim vremenima tretiranja: 5 (S-5), 10 (S-10) i 15 min (S-15)



Grafikon 2. Promjena temperature ($^{\circ}\text{C}$) alkoholnih ekstrakata koprive (tijekom ultrazvučnog tretmana u kupelji) u različitim vremenima tretiranja: 10 (K-10), 15 (K-15) i 30 min (K-30)

3.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara

Analizirani su sljedeći fizikalno-kemijski parametri alkoholnih ekstrakata koprive: gustoća otopine (g/cm^3), električna provodljivost otopine ($\mu\text{S/cm}$), sadržaj ukupnih kiselina (%) i pH vrijednost.

3.2.1. Određivanje gustoće otopine

Gustoća otopine (g/cm^3) alkoholnih ekstrakata koprive određena je digitalnim denziometrom (Mettler Toledo, Densito 30PX, Švicarska) direktnim očitanjem na uređaju koji je prethodno baždaren.

3.2.2. Određivanje električne provodljivosti

Električna provodljivost ($\mu\text{S/cm}$) uzoraka određena je uređajem (Mettler Toledo SevenEasy Conductivity, Švicarska) uranjanjem sonde izravno u uzorak.

3.2.3. Određivanje ukupne kiselosti

Ova se metoda temelji na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijevog hidroksida. Primjenjuje se za određivanje ukupne kiselosti u voću i povrću i proizvodima od voća i povrća (Voća i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

- Graduirana pipeta, volumena 25 mL i 100 mL
- Odmjerna tikvica, volumena 250 mL
- Analitička vaga (Sartorius)
- Ph-metar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Automatska bireta
- Filter papir

Reagensi:

- Natrijev hidroksid, otopina c (NaOH)=0,1 mol/L
- Puferna otopina poznate pH vrijednosti

Priprema uzoraka:

Uzorak se homogenizira i odvagne se 10 g. Uzorak se prenese u odmjernu tikvicu volumena 250 ml, tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice dobro se promućka i profiltrira. pH-metar se baždari pomoću puferne otopine. Ovisno očekivanoj kiselosti otpipetira se 20 mL uzorka i prenese u čašu s magnetom koji pospješuje miješanje. Mješalica se pusti u rad te se iz birete dodaje otopina natrijevog hidroksida dok se ne postigne pH od oko 7. Tada se dodavanje uspori do pH $8,1 \pm 0,2$. (Voća i sur., 2011).

Formula:

$$\text{ukupne kiseline (\%)} = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen utrošene NaOH pri titraciji

F – faktor otopine NaOH

G (g/mL) – faktor najzastupljenije kiseline u uzorku

D (g) – masa uzorka u tekućini

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti vrši se na pH-metru uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitavanjem vrijednosti (Voća i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

- Čaša, volumena 25 mL
- Magneti za miješanje
- Magnetska mješalica (MM-510)
- pH-metar (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Analitička vaga (Sartorius)

Priprema uzoraka:

Homogenizirani uzorak potrebno je izvagati, prenijeti u odmjernu tikvicu te nadopuniti destiliranom vodom do oznake i profiltrirati.

Postupak određivanja:

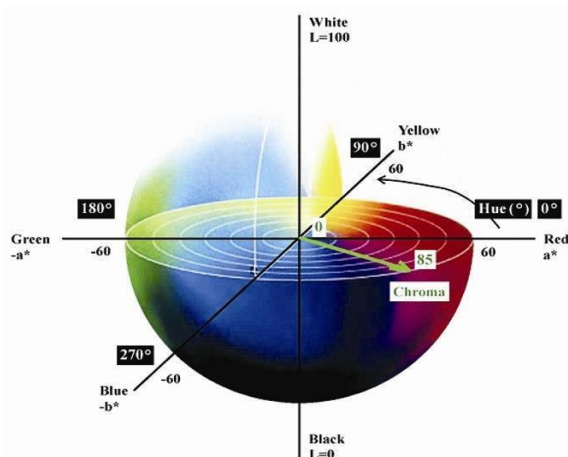
Prije mjerenja potrebno je baždariti uređaj puferskom otopinom poznate pH vrijednosti pri sobnoj temperaturi. pH vrijednost određuje se uranjanjem elektrode u uzorak.

3.2.5. Određivanje boje ekstrakata CIELAB metodom

Intenzitet boje utvrđivao se pomoću ColorTec PCM+ kolorimetra, odnosno CIELAB metodom. Ovom metodom se energija iz uzorka pomoću filtera pretvara u psihofizikalno funkciju, odnosno boju. Kolorimetar je fotolektrični tristimulusni uređaj što znači da se boje na njemu opisuju pomoću tri brojčane vrijednosti: L^* , a^* i b^* .

Vrijednost L^* označava intenzitet svjetla ili tame. Ako je vrijednost $L^* = 0$ tada nema refleksije što upućuje na prisutnost crne boje, a ako je $L^* = 100$ tada se radi o bijeloj boji i refleksija je najveća. Vrijednost a^* označava intenzitet crvene ili zelene boje, stoga negativne vrijednosti ($-a^*$) ukazuju na prisutnost zelene boje, a pozitivne vrijednosti ($+a^*$) ukazuju na prisutnost crvene boje. Vrijednost b^* označava intenzitet žute ili plave boje, stoga negativne vrijednosti ($-b^*$) ukazuju na prisutnost plave boje, a pozitivne vrijednosti ($+b^*$) ukazuju na prisutnost žute boje.

Na kromatskom dijagramu (Slika 5) se može očitati H^* vrijednost (vizualni doživljaj, ton boje) i C vrijednost (zasićenost boje) preko očitanih vrijednosti a^* i b^* na Hunterovom kolorimetru (AOACC, 1995).



3.3. Metode određivanja specijaliziranih metabolita i antioksidacijskog kapaciteta

Istraživanjem je određen sadržaj sljedećih specijaliziranih metabolita: sadržaj vitamina C (mg/100 g svježe tvari), sadržaj ukupnih fenola (flavonoida i neflavonoida) (mg GAE/100 g svježe tvari), klorofila a, klorofila b i ukupnih klorofila (mg/g), sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g) i antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$).

3.3.1. Određivanje sadržaja vitamina C

Ova se metoda primjenjuje za određivanje sadržaja askorbinske kiseline u proizvodima od voća i povrća. Reagens 2,6-p-diklorindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa istovremeno služi i kao indikator ove redoks reakcije (Voća i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

- Homogenizator (Zepter International)
- Analitička vaga (Sartorius)
- Odmjerna tikvica, volumena 100 mL
- Čaše, volumena 100 mL
- Bireta, volumena 50 mL

Reagensi:

- 2,6-p-diklorindofenol
- 2%-tna oksalna kiselina

Priprema uzoraka:

Na tehničkoj vagi odvaži se 10 g uzorka. Uzorak se kvantitativno uz dodatak 2%-tne otopine oksalne kiseline prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te se oksalnom kiselinom nadopuni do oznake.

Postupak određivanja:

Sadržaj iz odmjerne tikvice se profiltrira, a filtrat služi za određivanje askorbinske kiseline. Otpipetira se 10 mL filtrata koji se titrira otopinom 2,6-diklorfenolindofenola i to do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem pet sekundi. Iz volumena 2,6-diklorfenolindofenola utrošenog za titraciju filtrata, izračuna se količina L-askorbinske kiseline (vitamina C) u uzorku, koja se izražava mg/100 g svježe tvari (Voća i sur., 2011)

Formula:

$$\text{vitamin C (mg/100 g svježe tvari)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen 2,6-p-diklorindofenola utrošenog titracijom

F – faktor normaliteta 2,6-p-diklorindofenola

D (g) – masa uzorka u tekućini

Određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola:

Za određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebno je napraviti otopinu askorbinske kiseline koja će se titrirati otopinom 2,6-diklorfenolindofenola. Prema očitanoj volumenu potrebnog 2,6-diklorfenolindofenola izračuna se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu od 50 mL na analitičkoj vagi odvagane se $\pm 0,0100$ g askorbinske kiseline, a tikvica nadopuni do oznake 2 %-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL otpipetira se 5 mL 2 %-tne otopine oksalne kiseline i 5mL pripremljene otopine askorbinske kiseline te se titrira otopinom 2,6-diklorfenolindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana. Iz podatka utrošenog volumena otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebnog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračuna se faktor (F) otopine 2,6-diklorfenolindofenola (Voća i sur., 2011).

3.3.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Ukupni fenoli određuju se spektrofotometrijski u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 750 nm. Metoda se osniva na

bojanoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline. Kod oksidacije fenolnih spojeva ove se kiseline reduciraju u plavo obojeni volfram oksid i molibden oksid (Ough i Amerine, 1988).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometer (Schimadzu UV 1650 PC)
- Tehnička vaga
- Odmjerne tikvice 50 mL i 100 mL
- Tikvica s okruglim dnom, volumena 100 mL
- Pipete
- Kivete
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Povratno hladilo

Kemikalije:

- Etanol (80%)
- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Priprema uzoraka:

Na tehničkoj vagi odvaži se 10 g uzorka sa točnošću $\pm 0,01$ g te se homogenizira sa 40 mL 80%-tnog etanola. Homogena smjesa kuha se 10 minuta uz povratno hladilo, a zatim se dobiveni ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Zaostali talog zajedno s filter papirom ponovno se prebaci u tikvicu sa šlifom, u koju se dodaje 50 mL 80%-tnog etanola i dodatno se kuha uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakt spoji se s prethodnim ekstraktom i nadopuni 80%-tnim etanolom do oznake.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta te se redom dodaje: 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) i 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvice zatim se dobro promućka i

nadopuni destiliranom vodom do oznake. Nakon što su uzorci odstajali 2 sata na sobnoj temperaturi izmjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je odvagati 500 mg galne kiseline i otopiti je u 80%-tnom etanolu, zatim nadopuniti odmjernu tikvicu volumena 100 mL do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline pripreme se razrijeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL, na način da se otpipetira redom 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda („stock“ otopina) u svaku tikvicu koje se potom nadopunjavaju do oznake 80%-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 150, 250 i 500 mg/L.

U odmjerne tikvice od 50 mL zatim se otpipetira 0,5 mL uzorka iz tikvica i dodaje se 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i nakon 3 minute 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvica dobro se promiješa, nadopuni do oznake te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon što uzorci odstajali izmjeri se apsorbancija otopine spektrofotometrom pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac tako da na apscisi budu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbance.

Račun:

Baždarni pravac nacrtava se na računalu u programu Microsoft Excel, te se izračuna jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola

Formula: $y = 0,001x + 0,0436$

Gdje je:

y – apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

3.3.3. Određivanje flavonoida i neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima isto na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga
- Spektrofotometar (Schimadzu UV 1650 PC)
- Kivete
- Filter papir
- Erlenmeyer-ova tikvica sa šlifom i čepom, 25 mL
- Pipete, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Stakleni lijevci

Kemikalije:

- Klorovodična kiselina razrijeđena s vodom u omjeru 1:4
- Formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- Dušik za propuhivanje uzoraka
- Zasićena otopina natrijeva karbonata
- Folin-Ciocalteu reagens
- 80% etanol

Priprema uzoraka:

Ekstrakt ukupnih fenola (opisan u poglavlju 4.7.2.) koristi se i za određivanje flavonoida i neflavonoida.

Postupak određivanja:

U tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka te doda 5 mL otopine HCl (1:4) i 5 mL formaldehida. Smjesa se zatim propuše dušikom, zatvori i ostavi u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata uzorak se profiltrira i zatim slijedi isti postupak kao kod određivanja ukupnih fenola.

Račun:

Koncentracija neflavonoida izračunava se na način jednak izračunavanju koncentracije ukupnih fenola uzimajući u obzir dodatna razrijeđenja. Količina ukupnih flavonoida odredi se izračunom razlike količine ukupnih fenola i neflavonoida.

3.3.4. Određivanje klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila

Klorofilni pigmenti određivat će se spektrofotometrijski metodom po Holmu (1954) i Wetstteinu (1957). Cilj ove metode je odrediti koncentraciju kloroplastnih pigmenata (klorofil-a, klorofil-b i ukupnih klorofila a i b) u acetonskom ekstraktu biljnog materijala te preračunati koncentracije na mg/g svježe tvari (Šic Žlabur i sur., 2016).

Aparatura i pribor:

- vaga
- tarionik i tučak
- Büchnerov lijevak
- Erlenmeyerova tikvica (300 mL)
- vakuum pumpa na vodeni mlaz
- odmjerna tikvica od 25 mL
- spektrofotometar (Shimadzu UV 1650 PC)

Kemikalije:

- aceton
- Magnezijev karbonat
- Kvarcni pijesak (MgCO_3)

Postupak određivanja:

Postupak ekstrakcije i određivanja pigmenata treba izvoditi brzo, u zamračenim uvjetima. Odvagati uzorak voća ili povrća mase 6 g i prenijeti u tarionik. Na uzorak dodati oko pola žličice kvarcnog pijeska, pola žličice praha $MgCO_3$ (zbog neutralizacije kiselosti) i 10 mL acetona. Smjesu usitniti tučkom u tarioniku, te kvantitativno acetonom prenijeti na Büchnerov lijevak. Uzorak ekstrahiran acetonom filtrirati preko vakuuma. Nakon što se macerat profiltrira, filtrat kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 25 mL, koja se nadopuni do oznake acetonom. Spektrofotometrom očitati apsorbancu u dobivenom filtratu pri valnim duljinama 662, 644 i 440 nm koristeći aceton kao slijepu probu.

Dobivene vrijednosti apsorpcije (662A, 644A i 440A) uvrstiti u Holm- Weststainove jednadžbe za izračunavanje koncentracije pigmenata u mg/dm^3 :

$$klorofil\ a = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644} \quad mg/L$$

$$klorofil\ b = 21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662} \quad mg/L$$

$$klorofil\ a + b = 5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644} \quad mg/L$$

$$karotenoidi = 4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (klorofil\ a + b) \quad mg/L$$

Brojevi u jednadžbama su molarni apsorpcijski koeficijenti po Holmu i Weststainu.

Formula za izračunavanje koncentracije pigmenata na mg/g svježe tvari ploda glasi:

$$c\ (mg/g) = \frac{c_1 \times V}{m}$$

Gdje je:

c – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/g svježe tvari ploda

c_1 – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/L

V – volumen filtrata (odmjerne tikvice) mL

m – masa uzorka izražena u mg

3.3.5. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS + radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom

ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS+ kation se reducira u ABTS, s reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilokroman-2-karbonska kiseline) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan:

140 mM otopine kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$ (0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)

7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)

Stabilna ABTS+ otopina (88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine (140 mM) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati na sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava).

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tna otopina ABTS+ (1 mL ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbanca 1%-tne otopine ABTS+ pri 734 nm koja mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Ako apsorbanca otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbanca premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine ABTS+ treba dodati još par kapi stabilne ABTS+ otopine, a ako je apsorbanca prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu od 100 mL dodati još 96%-tnog etanola.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski):

160 μ L uzoraka pomiješa se sa 2 mL 1 %- tne otopine ABTS+ te se nakon 5 minuta mjeri apsorbanca pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol.

Izrada umjernog (kalibracijskog) pravca:

Za izradu umjernog (kalibracijskog) pravca u ATBS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje ABTS+ otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 mol/dm³. Najprije se pripremi stock otopina i to tako da se u odmjerne tikvici od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja koja se pripremaju u odmjernim tikvicama od 25 mL;

0 → 0 mL Troloxa (samo EtOH),

200 → 0,8 mL

400 → 1,6 mL

1000 → 4 mL

2000 → 8 mL

2500 → 10 mL

Nakon pripreme navedenih koncentracija Trolox-a iz svake tikvice u kojoj je navedena koncentracija Trolox-a uzima se 160 µL otopine Trolox-a i dodaje 2 mL 1%-tne ABTS+ otopine podešene apsorbance ($0,70 \pm 0,02$). Nakon što pomiješamo dodanu koncentraciju Trolox-a i 1%-tne ABTS+ otopine izmjeri se apsorbanca pri 734 nm. I tako za svaku točku koncentracije Trolox-a. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbance za svaku točku izradi se umjerni (kalibracijski) pravac.

3.4. Statistička obrada podataka

Podatci ovog istraživanja statistički su obrađeni u programskom sustavu SAS, verzija 9.3 (SAS/STAT, 2010). Svi tretmani ekstrakcije (ultrazvučna sustavom sonde i kupelji te klasična) provedeni su u dvije repeticije, dok su sve laboratorijske analize provedene u tri ponavljanja. Dobiveni rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Dobivene vrijednosti uspoređene su t-testom (LSD) i smatraju se značajno različitim pri $p \leq 0,0001$.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Fizikalno-kemijska svojstva alkoholnih ekstrakata koprive

U Grafikonima 3-11 prikazani su rezultati fizikalno-kemijskih svojstava alkoholnih ekstrakata praha koprive. Za sva analizirana svojstva, osim za gustoću, utvrđene su visoko signifikantne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) s obzirom na način (ultrazvučna ekstrakcija sondom i kupelji te klasična ekstrakcija) i vrijeme ekstrakcije.

4.1.1. Gustoća uzoraka

Gustoća je jedan od vrlo važnih svojstava otapala koji izravno utječe na sposobnost ultrazvuka da izazove fenomen prijelazne kavitacije (Šic Žlabur i sur., 2018).

U Grafikonu 3 prikazani su rezultati gustoće alkoholnih ekstrakata tretiranih ultrazvučno (sondom i u kupelji) te klasično. Najveća zabilježena vrijednost gustoće iznosila je $0,97 \text{ g/cm}^3$ kod uzorka koji je ekstrahirao ultrazvučnom (UZV) sondom 15 minuta (S-15), dok je najniža vrijednost od $0,95 \text{ g/cm}^3$ zabilježena kod uzorka ekstrahiranog UZV sondom 10 minuta (S-10).

Statističkom obradom podataka utvrđeno je sljedeće: između vrijednosti uzoraka nije zabilježena signifikantna razlika, odnosno uzorci se međusobno značajno ne razlikuju u gustoći s obzirom na način i vrijeme tretmana.

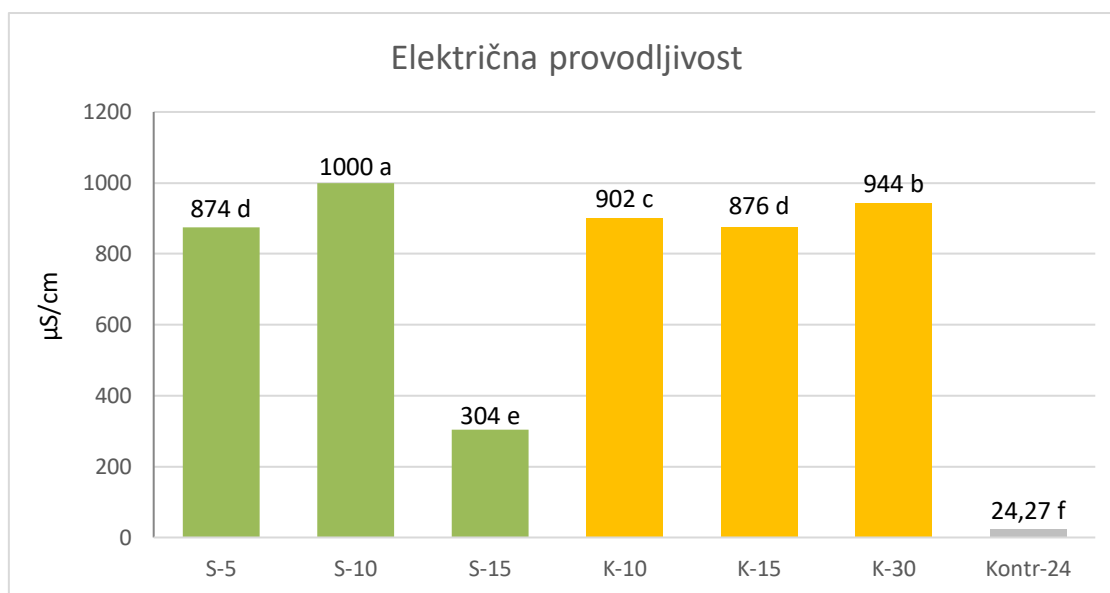


Grafikon 3. Gustoća (g/cm³) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

4.1.2. Električna provodljivost

U Grafikonu 4 prikazani su rezultati električne provodljivosti alkoholnih ekstrakata koprive pripremljenih različitim načinima ekstrakcije. Utvrđene su signifikantne razlike između svih analiziranih uzoraka, odnosno način ekstrakcije kao i vrijeme, značajno su utjecali na električnu provodljivost ekstrakata. Najveća vrijednost (1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) zabilježena je kod uzorka ultrazvučne ekstrakcije sondom u vremenskom trajanju od 10 minuta (S-10), dok je najmanja vrijednost (24,27 $\mu\text{S}/\text{cm}$) zabilježena kod uzorka ekstrahiranog klasičnim načinom (Kontr-24). Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvukom (sonda i kupelj) s kontrolnim uzorkom (Kontr-24) utvrđene su značajno više vrijednosti električne vodljivosti uzoraka tretiranih ultrazvukom.

Više vrijednosti električne provodljivosti ukazuju na prisutnost vode, minerala i proteina koji su vrlo dobri vodiči električne energije. Neka od provedenih istraživanja pokazala su pozitivan utjecaj ultrazvuka na povećanje vrijednosti električne provodljivosti (Brnčić i Šić Žlabur, 2019). Tako su na primjer, Aadil i sur. (2015) utvrdili povećanje električne vodljivosti u uzorcima soka od borovnice tretiranim ultrazvukom u vremenskom periodu od 90 minuta za 11% u usporedbi s uzorkom ekstrahiranih klasičnim načinom.



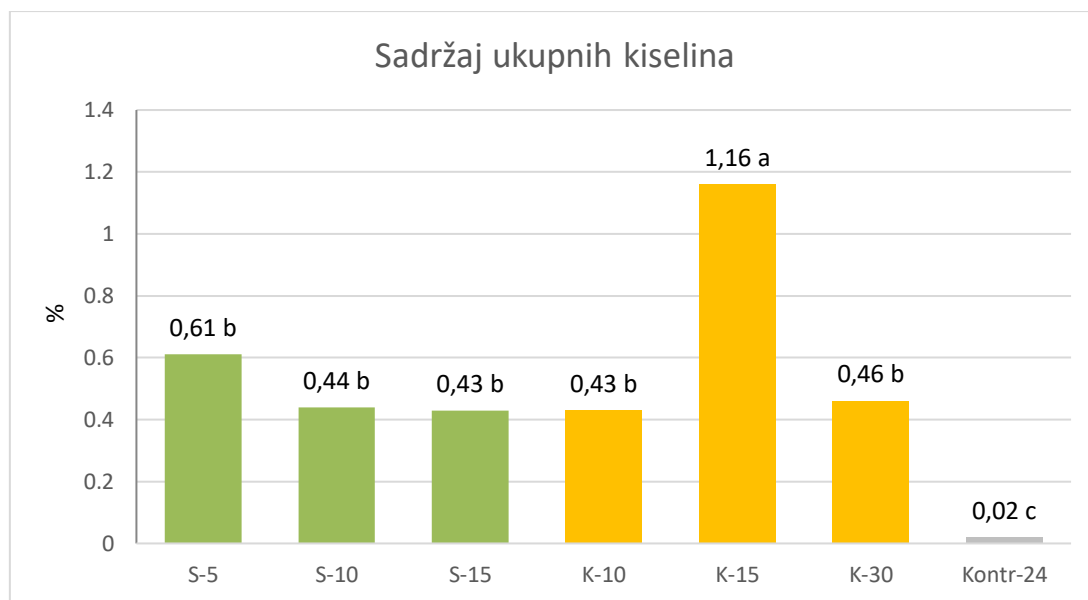
Grafikon 4. Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min-, S-10 i 15 min S-15 min), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30 min) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

4.1.3. Sadržaj ukupnih kiselina

Grafikon 5 prikazuje sadržaj ukupnih kiselina (%) analiziranih alkoholnih ekstrakata koprive. Najveća vrijednost (1,16%) ukupnih kiselina utvrđena je u uzorku tretiranim ultrazvukom u kupelji u trajanju od 15 min (K-15), dok najmanja vrijednost (0,02%) u uzorku kontrole (Kontr-24).

Način ekstrakcije (ultrazvuk i klasično) imao je značajan utjecaj na sadržaj ukupnih kiselina. Naime, kod uzoraka ekstrahiranih ultrazvučno, neovisno o tipu uređaja, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, utvrđene su značajno veće vrijednosti ukupnih kiselina, a što potvrđuje učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije na sadržaj istih. Uspoređujući način ultrazvučne ekstrakcije, odnosno upotrebu sonde ili kupelji, a neovisno o vremenu trajanja tretmana, može se zaključiti kako su više vrijednosti ukupnih kiselina zabilježene tretmanom u kupelji. Također, vrijeme tretiranja ima značajan utjecaj na sadržaj ukupnih kiselina. Kod UZV tretmana sondom razlike u sadržaju ukupnih kiselina nisu bile statistički opravdane (nisu zabilježene značajne razlike), no kod tretmana u kupelji vrijeme je značajnije utjecalo, a prilikom čega valja izdvojiti tretman od 15 min koji je dao najviše vrijednosti ukupnih kiselina. Aadil i sur. (2013) istraživali su utjecaj ultrazvuka (kupelji pri frekvenciji od 38 kHz i vremenu

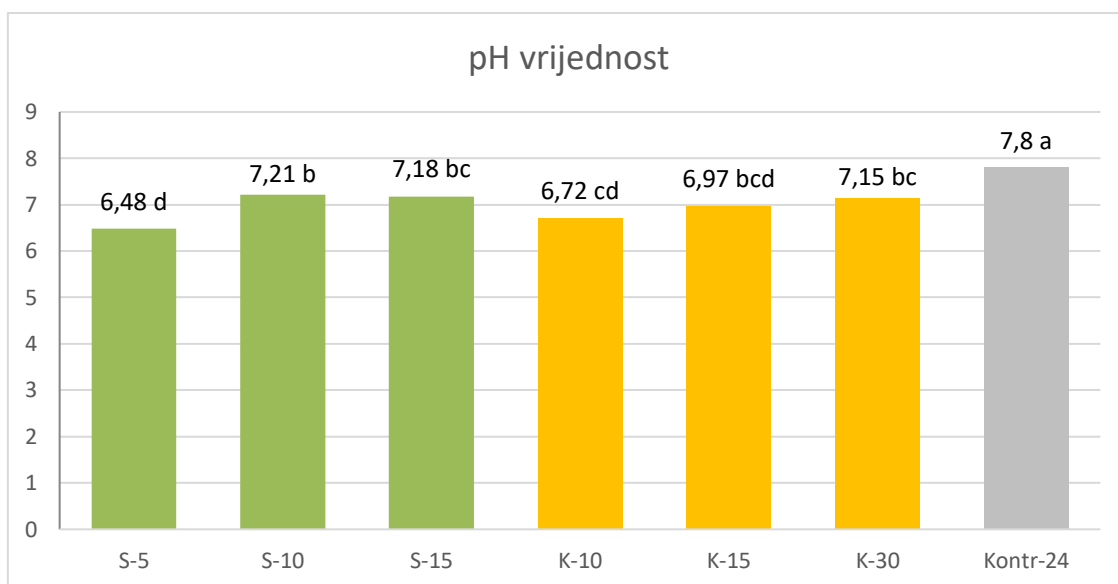
od 30, 60 i 90 min) na ukupnu kiselost soka od grejpa, a prilikom čega nisu utvrdili značajni utjecaj ultrazvuka na sadržaj kiselina. No, s druge strane autori Šic Žlabur i sur. (2017) utvrdili su pozitivne promjene u sadržaju ukupnih kiselina u uzorcima soka od jabuke s dodatkom praha aronije tretiranim ultrazvukom.



Grafikon 5. Sadržaj ukupnih kiselina (%) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

4.1.4. pH vrijednost

Grafikon 6 prikazuje pH vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 6,48 do 7,80. Najvišu utvrđenu pH vrijednost (7,80) imao je kontrolni uzorak (Kontr-24). Najniža zabilježena vrijednost je 6,48 i to u uzorku ekstrakta tretiranog ultrazvučnom sondom u trajanju od 5 min (S-5). Ovim istraživanjem utvrđeno je da je uporaba ultrazvuka imala velik utjecaj na pH vrijednosti alkoholnih ekstrakata. Istraživanjem utjecaja ultrazvuka na pH vrijednosti skupina autora Aadil i sur. (2013) nisu utvrdili značajne promjene pH vrijednosti, dok su Šic Žlabur i sur. (2017) utvrdili pozitivan utjecaj ultrazvuka na pH vrijednost u uzorcima soka od jabuke s dodatkom praha aronije.

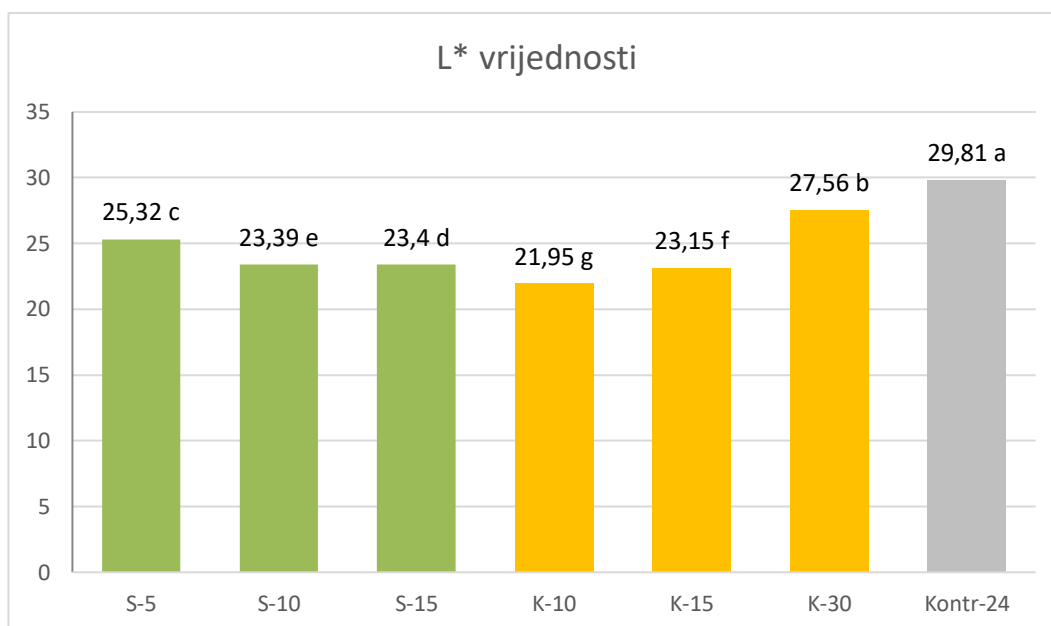


Grafikon 6. pH vrijednost alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

4.1.5. Kromatski parametri ekstrakata koprive

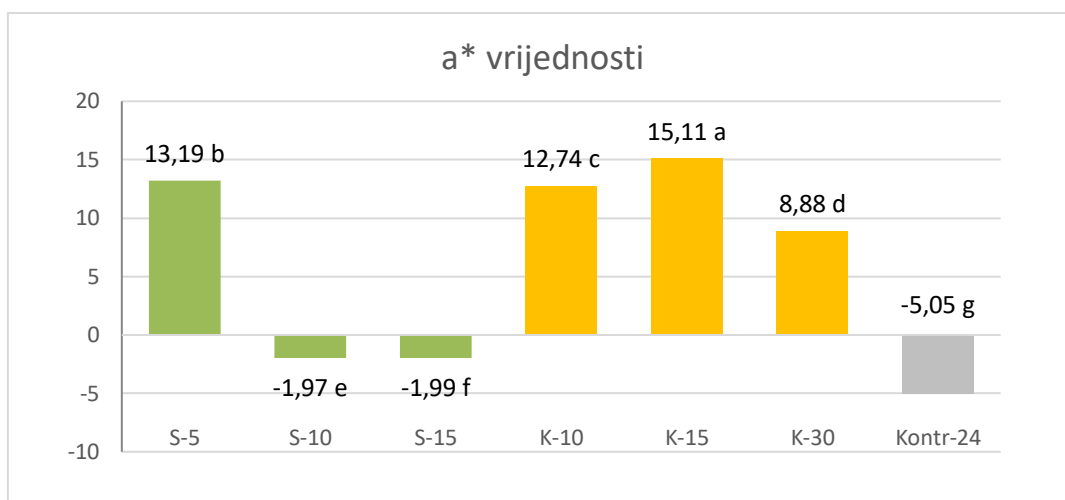
U Grafikonima 7-11 prikazani su kromatski parametri (L^* , a^* , b^* , C i h°) analiziranih uzoraka ekstrakata koprive.

L^* vrijednost predstavlja intenzitet svjetla ili tame (grafikon 7). Najveća L^* vrijednost (29,81) utvrđena je za kontrolni uzorak, a najmanja (21,95) za uzorak tretiran ultrazvukom u kupelji u trajanju od 10 min (K-10). Kod uzoraka tretiranih ultrazvučnom sondom, duljim provođenjem ultrazvučnog tretmana (10 i 15 minuta) utvrđeno je smanjenje L^* vrijednosti, odnosno uzorci su potamnili. S druge strane, kod uzoraka tretiranih u kupelji duljim provođenjem tretmana (15 i 30 minuta), ekstrakti su posvijetlili, odnosno zabilježene su više L^* vrijednosti.



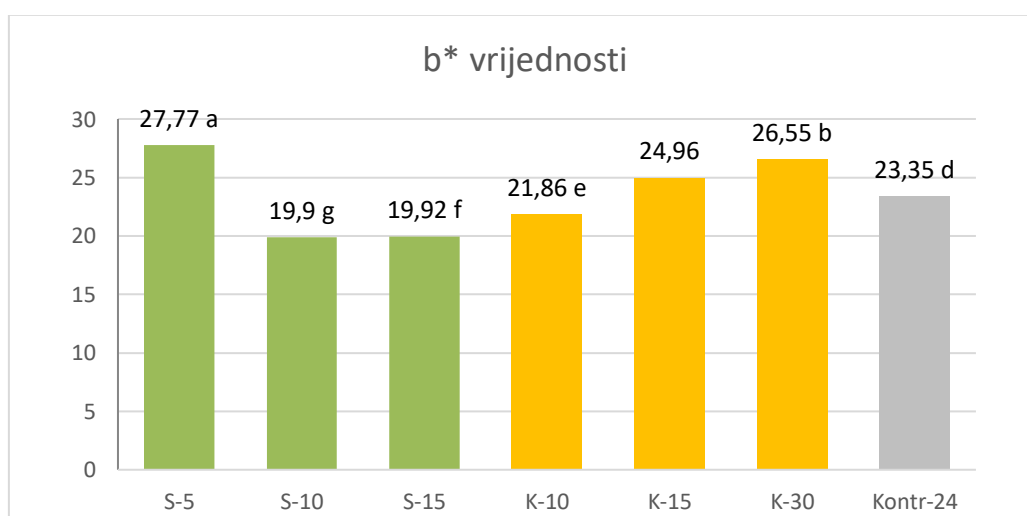
Grafikon 7. L* vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Vrijednost a* (Grafikon 8) predstavlja intenzitet crvene ili zelene boje. Pozitivne a* vrijednosti upućuju na crvenu boju, dok negativne na zelenu boju. U ovom istraživanju najveća a* vrijednost je 15,11 u uzorku tretiranom u kupelji 15 minuta (K-15), dok je najmanja vrijednost -5,05 zabilježena u kontrolnom uzorku (Kontr-24), te je on najsvjetlije zelene boje. Uzorci tretirani u kupelji (K-10, K-15, K-30) imali su pozitivne a* vrijednosti, stoga može se zaključiti da su tamnije zelene boje u usporedbi s uzorcima tretiranih ultrazvučnom sondom (S-10, S-15). Odmakom vremena kod ultrazvučnog tretmana u kupelji, a* vrijednosti su se smanjile, odnosno uzorci su bili svjetlije zelene boje (K-30). Isti slučaj dogodio se i kod ultrazvučnog tretmana sondom gdje je s odmakom vremena tretiranja došlo do smanjenja a* vrijednosti, odnosno uzorci su poprimili svjetlije zeleno obojenje.



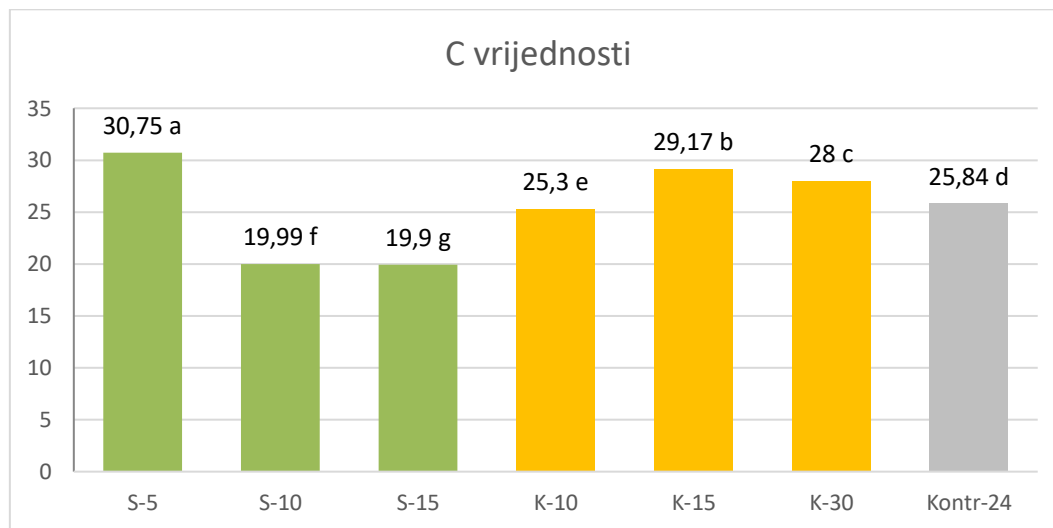
Grafikon 8. a* vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Vrijednost b* (Grafikon 9) upućuje na intenzitet plave ili žute boje. Pozitivne b* vrijednosti ukazuju na žutu boju, a negativne na plavu boju. Najveća b* vrijednost (27,77) analiziranih alkoholnih ekstrakata koprive utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 5 minuta (S-5), dok je najmanja vrijednost (19,90) utvrđena također za ekstrakt tretiran sondom, no u trajanju od 10 minuta (S-10). Prema prikazanim rezultatima kod uzoraka gdje je ultrazvučni tretman proveden sondom duljim vremenskim periodom, b* vrijednosti se smanjuju, odnosno uzorci su tamnije boje. S druge strane, uzorci tretirani u kupelji s odmakom vremena tretiranja imaju svjetliju boju.

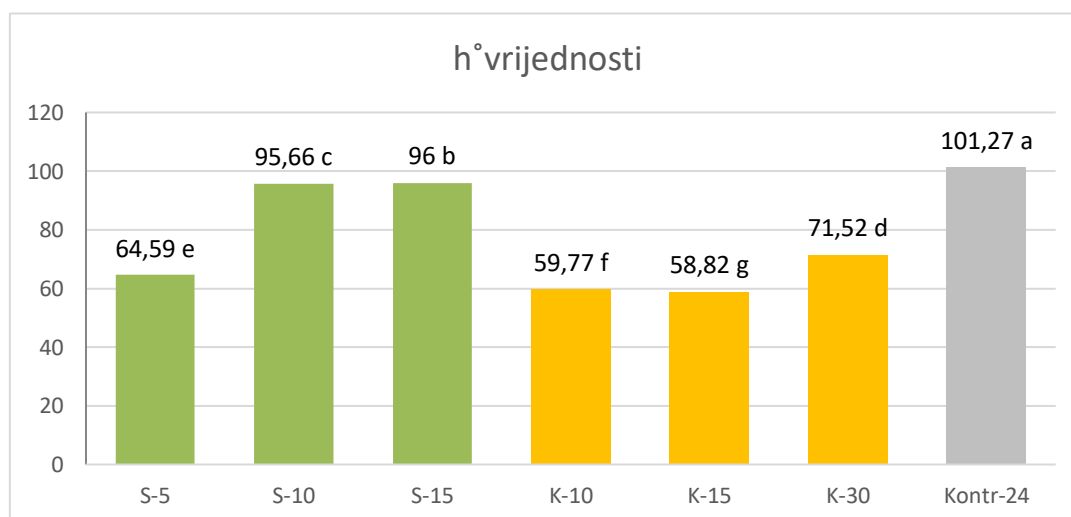


Grafikon 9. b* vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

C vrijednost (Grafikon 10) predstavlja zasićenost boje, dok h° vrijednost (Grafikon 11) predstavlja njen vizualni doživljaj ili ton. Najveća C vrijednost alkoholnih ekstrakata koprive 30,75 utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 5 min (S-5), dok je najmanja vrijednost (19,9) utvrđena za uzorak tretiran sondom u trajanju od 15 min (S-15). Najveća h° vrijednost iznosi 101,27 i utvrđena je za kontrolni uzorak (Kontr-24), dok najmanja vrijednost iznosi 58,82 i utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvukom u kupelji tijekom 15 min (K-15).



Grafikon 10. C vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)



Grafikon 11. h° vrijednosti alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Mnoga istraživanja ukazuju na značajne promjene boje ultrazvučno tretiranih uzoraka voća i povrća, što se može pripisati oksidativnim reakcijama koje nastaju zbog interakcija slobodnih radikala, a koje su inducirane pojavom kavitacije (Brnčić i Šic Žlabur, 2019). Aadil i sur. (2015) ultrazvučnom ekstrakcijom uzoraka soka grejpa, ustanovili su da se L^* , a^* i b^* vrijednosti smanjuju uporabom ultrazvuka (negativan utjecaj), a slične rezultate prikazali su Tiwari i sur. (2008) na uzorcima soka od naranče. Smanjenje L^* , a^* i b^* parametara također je utvrđeno i ultrazvučnim tretmanom na soku od rajčice (Adekunte i sur., 2010).

4.2. Specijalizirani metaboliti i antioksidacijski kapacitet

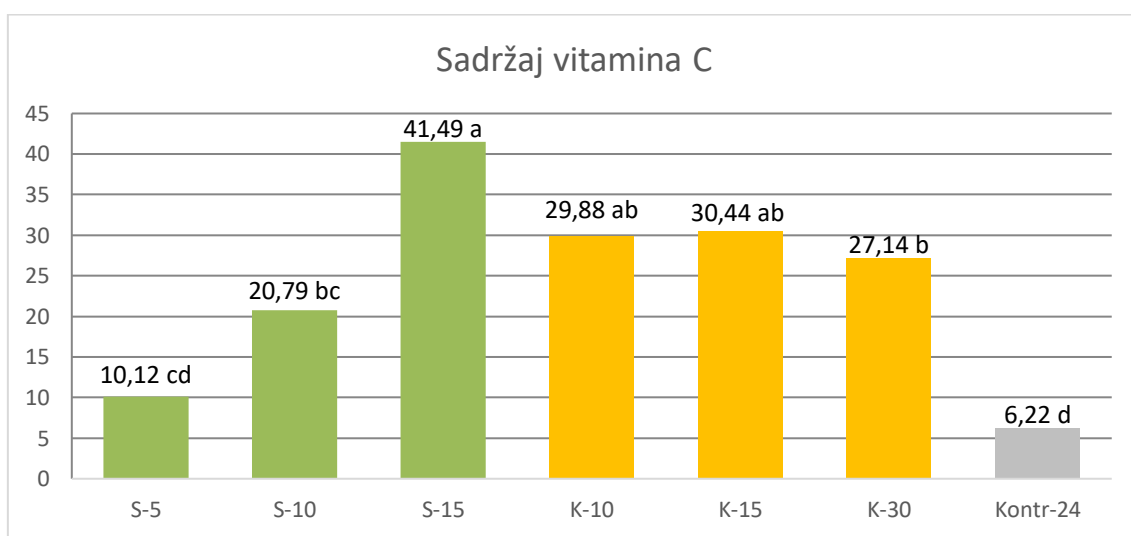
U Grafikonima 12-18 prikazani su rezultati sadržaja analiziranih bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet alkoholnih ekstrakata koprive različitim metodama ekstrakcije. Za sve analizirane komponentne utvrđene su značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) s obzirom na način ekstrakcije (ultrazvuk i klasično), tip ultrazvučnog uređaja (sonda i kupelj) te vrijeme trajanja ekstrakcije.

4.2.1. Sadržaj vitamina C

Najveća vrijednost vitamina C (41,49 mg/100 g sv.t.) utvrđena je u uzorku ekstrakta koprive tretiranog ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najmanja vrijednost (6,22 mg/100 g sv.t.) zabilježena u kontrolnom uzorku (Kontr-24) (Grafikon 12). Vrijednosti vitamina C značajno su se razlikovale ovisno o načinu ekstrakcije (ultrazvuk i klasično), ali i o tipu korištenog ultrazvučnog uređaja (sonda i kupelj). Naime, neovisno o vremenu trajanja tretmana, nešto više prosječne vrijednosti vitamina C utvrđene su u uzorcima tretiranim ultrazvukom u kupelji, a čemu razlog može biti i temperatura tijekom tretmana (Grafikoni 1 i 2), kao i to da je tretman sondom u trajanju od 5 min bio prekratak za ekstrakciju vitamina C iz biljnog materijala u okolno otapalo. U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2017) utvrđeno je povećanje sadržaja vitamina C tijekom tretmana ultrazvukom uzoraka soka od jabuke s dodatkom praha aronije. Ultrazvučna ekstrakcija provodila se u ultrazvučnoj kupelji (35 kHz i 140 W) tijekom 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minuta što je značajno doprinijelo povećanju sadržaja vitamina C. Zabilježen je porast od čak 49% u usporedbi s kontrolnim

uzorkom. Nadalje, Abid i sur. (2013) također su utvrdili povećanje sadržaja vitamina C u uzorcima soka od jabuke i to za 34% tijekom ultrazvučnog tretmana u vremenskom periodu od 90 minuta. Ipak, prema Brnčić i Šic Žlabur (2019) postoji mogućnost blagog smanjenja sadržaja vitamina C tijekom ultrazvučnog tretmana, što može biti uzrokovano porastom temperature sustava kao očekivanom posljedicom mehanizma prijelazne kavitacije.

Iz svega navedenoga, može se zaključiti kako je tretman ultrazvukom u ovom istraživanju pozitivno utjecao na sadržaj vitamina C uz nužno potrebnu optimizaciju vremena tretmana.



Grafikon 12. Sadržaj vitamina C (mg/100 g) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

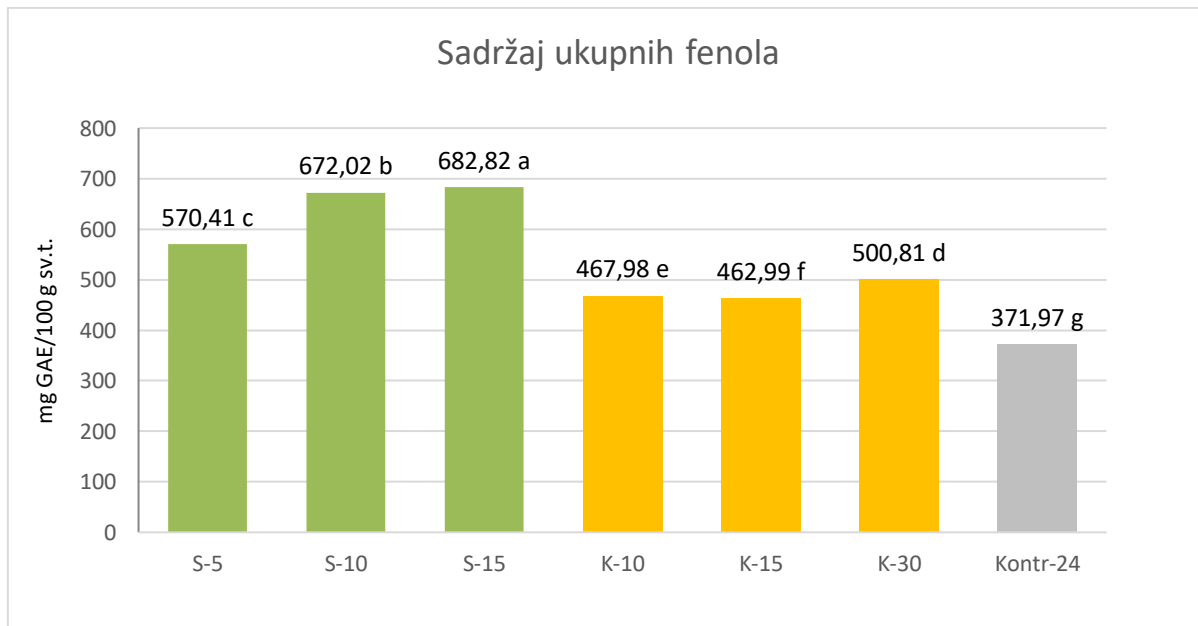
4.2.2. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida

Spojevi kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, flavoni, flavonoli i općenito polifenolni spojevi, pokazuju pozitivan utjecaj ovisno o tretmanu ultrazvuka, a što se može objasniti pojačanim formiranjem -OH skupina prilikom prolaska ultrazvučnog vala, odnosno posljedično mehanizma prijelazne kavitacije u nekom tekućem mediju. Upravo zbog navedenog, većina autora u svojim istraživanjima navodi pozitivan utjecaj ultrazvuka na grupu polifenolnih spojeva (Brnčić i Šic Žlabur, 2019).

Grafikon 13 prikazuje sadržaj ukupnih fenola alkoholnih ekstrakata praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost ukupnih fenola iznosi 682,82 mg GAE/100 g sv.t., a utvrđena je

za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost (371,97 mg GAE/100 g sv.t.) utvrđena za kontrolni uzorak, odnosno uzorak u kojemu je prah ekstrahiran klasično (Kontr-24). Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvučnom sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, i uzorak ekstrahiran klasično može se utvrditi kako je sadržaj ukupnih fenola čak 72% veći u ekstraktima tretiranim sondom. Također, značajne razlike ukupnih fenola utvrđene su između uzoraka tretiranih sondom i u kupelji (tip uređaja), neovisno o vremenu trajanja tretmana, a pri čemu su oko čak 35% više vrijednosti fenola utvrđene u uzorcima tretiranim sondom. Vrijeme tretmana također je značajno utjecalo na sadržaj ukupnih fenola i u tretmanu sondom i u kupelji, a općenito se za oba tretmana može utvrditi kako je dulje vrijeme tretiranja (kod sonde 15 min, a kod kupelji 30 min) pozitivno utjecalo na sadržaj ukupnih fenola. Također, pozitivan utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih fenola utvrdili su i drugi autori u čijim je istraživanjima zabilježen porast sadržaja ukupnih fenola (Šic Žlabur i sur., 2015; Šic Žlabur i sur., 2017).

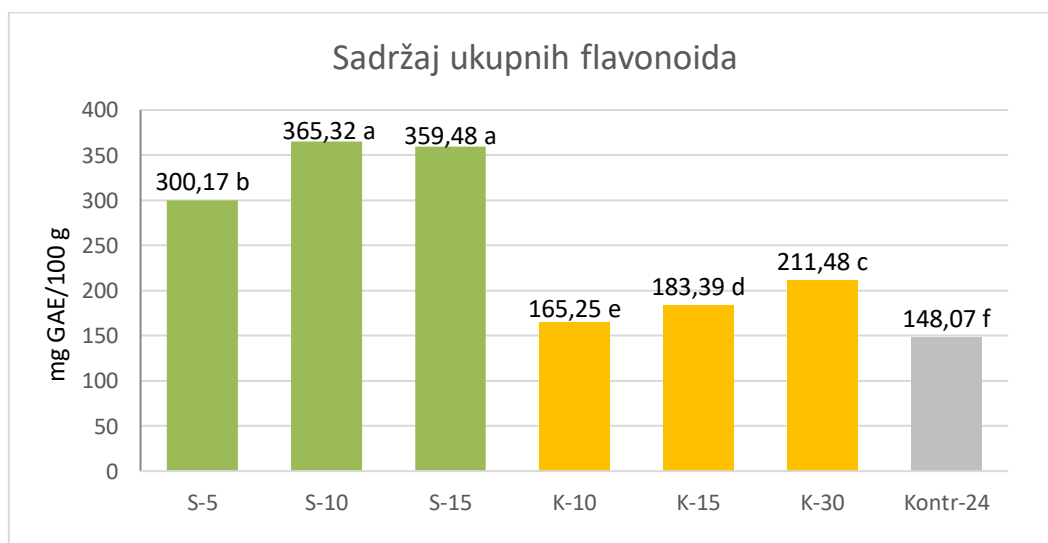
Na kraju, važno je napomenuti kako su, neovisno o načinu ekstrakcije, u svim alkoholnim ekstraktima koprive utvrđene visoke vrijednosti ukupnih fenola što upućuje na njihovu značajnu funkcionalnu vrijednost.



Grafikon 13. Sadržaj ukupnih fenola alkoholnih ekstrakata praha tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

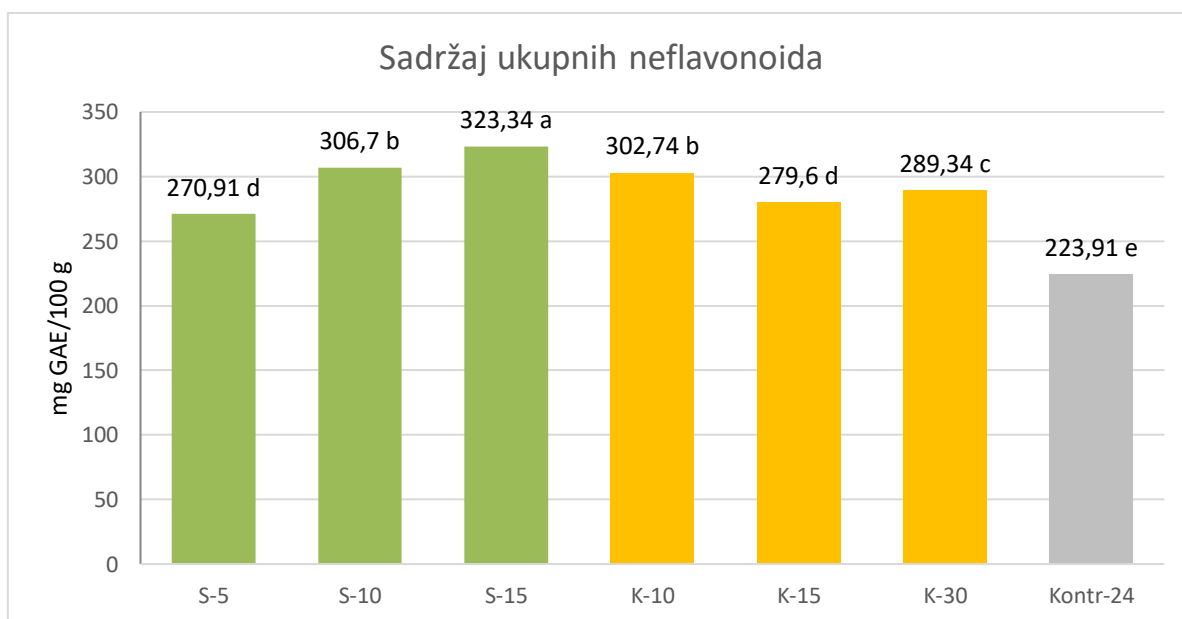
Grafikon 14 prikazuje sadržaj ukupnih flavonoida alkoholnih ekstrakata praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost ukupnih flavonoida iznosi 365,32 mg GAE/100 g, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 10 minuta (S-10), dok je najniža zabilježena vrijednost 148,07 mg GAE/100 g utvrđena za kontrolni uzorak, odnosno uzorak u kojemu je prah ekstrahirano klasično (Kontr-24). Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvučnom sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, i uzorka ekstrahiranog klasično može se utvrditi kako je sadržaj ukupnih flavonoida veći u ekstraktima tretiranih sondom za čak 57%. Također, značajne razlike ukupnih flavonoida utvrđene su između uzoraka tretiranih u kupelji i kontrolnog uzorka, neovisno o vremenu trajanja tretmana, a pri čemu su više vrijednosti flavonoida utvrđene u uzorcima tretiranim ultrazvučno u kupelji i to za 26%. Vrijeme tretmana značajno je utjecalo na sadržaj ukupnih flavonoida u tretmanu u kupelji te se može zaključiti kako je dulje vrijeme tretiranja (30 min, uzorak K-30) pozitivno utjecalo na sadržaj ukupnih flavonoida. Između uzoraka tretiranih UZV sondom i u kupelji, uočena je značajna razlika u vrijednostima ukupnih flavonoida, pri čemu su vrijednosti kod uzoraka tretiranih sondom veće za čak 83% u odnosu na uzorke tretirane u kupelji. Stoga, može se zaključiti da je uporaba sonde u kraćem vremenskom periodu djelovala iznimno učinkovito na povećanje vrijednosti ukupnih flavonoida u usporedbi s tretmanom u kupelji.

U istraživanjima Abid i sur. (2013) i Zou i sur. (2017) utvrđeno je povećanje sadržaja ukupnih flavonoida tijekom ultrazvučnog tretmana.



Grafikon 14. Sadržaj ukupni flavonoida (mg GAE/100 g) alkoholnih ekstrakata praha koprive UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Grafikon 15 prikazuje sadržaj ukupnih neflavonoida alkoholnih ekstrakata praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost ukupnih neflavonoida iznosi 323,34 mg GAE/100 g, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 minuta (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 223,91 mg GAE/100 g utvrđena za kontrolni uzorak, odnosno uzorak u kojemu je prah ekstrahiran klasično (Kontr-24). Uspoređujući uzorke tretirane ultrazvučnom sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, i uzorka ekstrahiranog klasično može se utvrditi kako je sadržaj ukupnih neflavonoida veći u ekstraktima tretiranih sondom i to za 34%. Također, značajne razlike ukupnih neflavonoida utvrđene su između uzoraka tretiranih u kupelji i kontrolnog uzorka, neovisno o vremenu trajanja tretmana, a pri čemu su više vrijednosti neflavonoida utvrđene u uzorcima tretiranim u kupelji, za gotovo 30%. Pozitivan utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih neflavonoida, odnosno njegovo povećanje zabilježeno je i u drugim istraživanjima (Abid i sur., 2013; Alighourchi i sur., 2013; Zou i sur., 2017).



Grafikon 15. Sadržaj ukupni neflavonoida (mg GAE/100 g) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

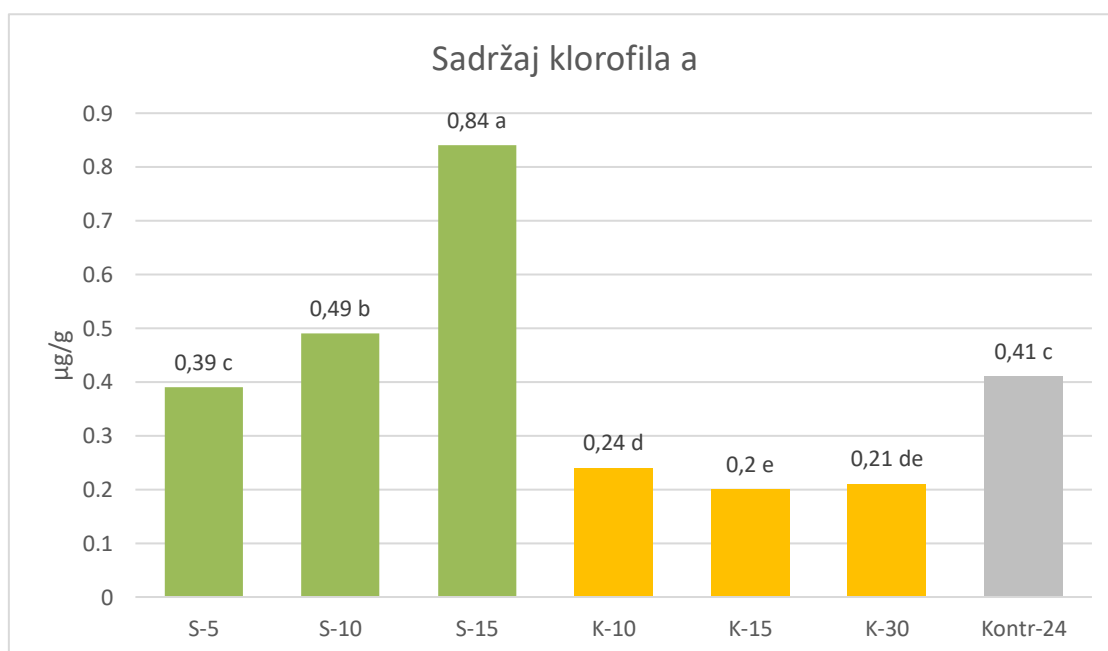
4.2.3. Sadržaj pigmentnih spojeva alkoholnih ekstrakata koprive

U Grafikonima 16-19 prikazani su rezultati sadržaja analiziranih pigmentnih spojeva: klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila i karotenoida alkoholnih ekstrakata koprive. Prema

provedenoj statističkoj analizi podataka, svi analizirani pigmentni spojevi ekstrakata značajno se razlikuju ($p \leq 0,0001$) ovisno o načinu i vremenu ekstrakcije.

Grafikon 16 prikazuje vrijednosti klorofila a u alkoholnim ekstraktima praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost klorofila a iznosi 0,84 $\mu\text{g/g}$, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 0,2 $\mu\text{g/g}$ utvrđena u uzorku tretiranom ultrazvukom u kupelji u istom vremenskom trajanju (K-15).

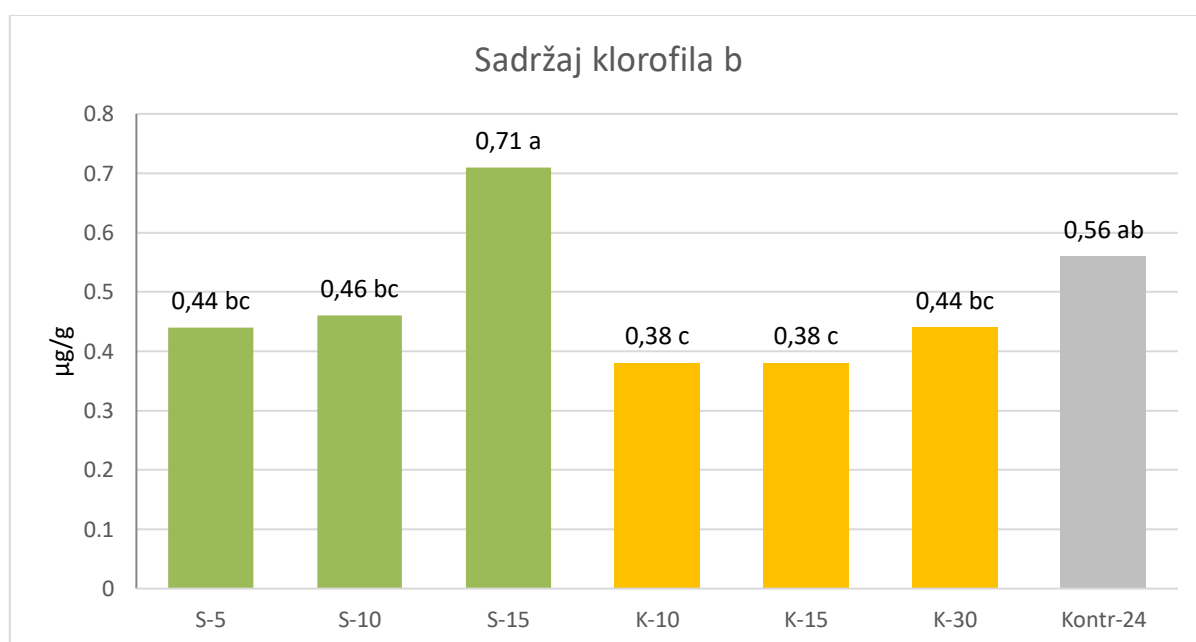
Prema Šic Žlabur i Brnčić (2019) biljni pigmenti su, s obzirom na procesne uvjete, iznimno osjetljivi spojevi, posebno na toplinu. Postupci koji uključuju porast temperature često uzrokuju degradaciju i gubitak biljnih pigmenata u tkivu. U ovom istraživanju uočeno je da je ekstrakcija uz pomoć ultrazvučne sonde, neovisno o vremenu tretiranja, pozitivno utjecala na sadržaj klorofila a, odnosno prilikom tretmana sondom utvrđene su čak više od dvostruko viših vrijednosti u usporedbi s tretmanom u kupelji. Vrijeme tretmana također je pozitivno utjecalo na sadržaj klorofila a, kod tretmana sondom, no kod tretmana u kupelji dulje vrijeme tretmana (30 min) imalo je suprotan, odnosno negativan utjecaj na sadržaj istog.



Grafikon 16. Sadržaj klorofila a ($\mu\text{g/g}$) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Grafikon 17 prikazuje vrijednosti klorofila b u alkoholnim ekstraktima praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost klorofila b iznosi 0,71 $\mu\text{g/g}$, a utvrđena je za uzorak tretiran

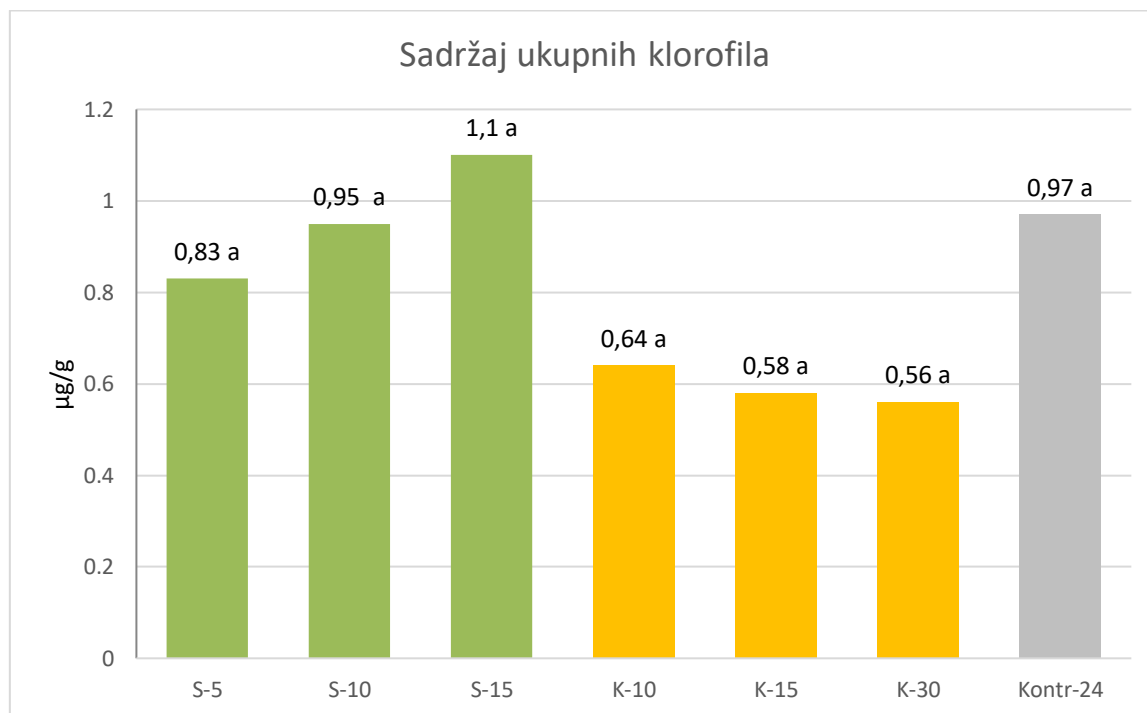
ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 0,38 $\mu\text{g/g}$ te je utvrđena u dva uzorka tretirana ultrazvukom u kupelji u vremenskom trajanju od 10 i 15 minuta (K-10, K-15). Temeljem prikazanih rezultata, u ovom istraživanju utvrđen je pozitivan učinak ultrazvučne ekstrakcije na povećanje sadržaja klorofila b, a prilikom čega valja naglasiti kako je tretman ultrazvučnom sondom u vremenskom intervalu od 15 minuta najviše utjecao na povećanje sadržaja klorofila b u ekstraktima koprive. Vrijeme tretmana pozitivno je utjecalo na sadržaj klorofila b i kod tretmana sondom i kod tretmana u kupelji.



Grafikon 17. Sadržaj klorofila b ($\mu\text{g/g}$) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Grafikon 18 prikazuje sadržaj ukupnih klorofila u alkoholnim ekstraktima praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost ukupnih klorofila iznosi 1,1 $\mu\text{g/g}$, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 0,56 $\mu\text{g/g}$ utvrđena u dva uzorka tretirana ultrazvukom u kupelji u vremenskom trajanju od 30 minuta (K-30). Vrijeme tretmana pozitivno je utjecalo na sadržaj ukupnih klorofila kod tretmana sondom, no kod tretmana u kupelji dulje vrijeme tretmana (30 minuta) negativno je utjecalo na sadržaj istoga.

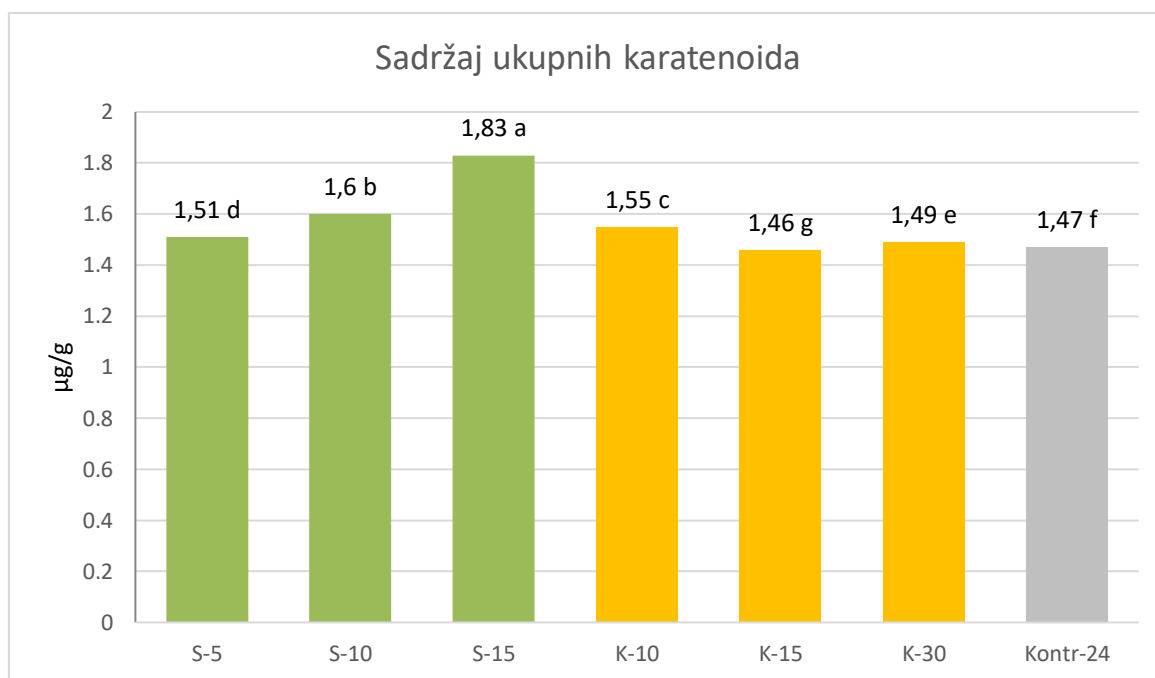
Vrijednosti koje su dobivene ekstrakcijom UZV sondom znatno su više nego vrijednosti dobivene ekstrakcijom u kupelji, a što je i očekivano jer su vrijednosti klorofila a i klorofila b bile više kod ekstrakcije sondom (S-15).



Grafikon 18. Sadržaj ukupnih klorofila (µg/g) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

Grafikon 19 prikazuje sadržaj ukupnih karotenoida u alkoholnim ekstraktima praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost ukupnih karotenoida iznosi 1,83 µg/g, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 1,46 µg/g utvrđena u uzorku tretiranom ultrazvukom u kupelji u vremenskom trajanju od 15 minuta (K-15). Vrijeme tretmana pozitivno je utjecalo na sadržaj ukupnih karotenoida kod tretmana sondom. Ovim istraživanjem utvrđeno je da ultrazvuk pozitivno utječe na ekstrakciju ukupnih karotenoida, ali kao u prethodnim primjerima najbolji rezultati utvrđeni su kod uzorka ekstrahiranog sondom u vremenskom periodu od 15 minuta (S-15).

Povećanje ukupnih karotenoida dokazano je istraživanjem Ordonez-Santos i sur. (2017) ultrazvučnom obradom uzoraka soka peruanske jagode (*Physalis peruviana*).



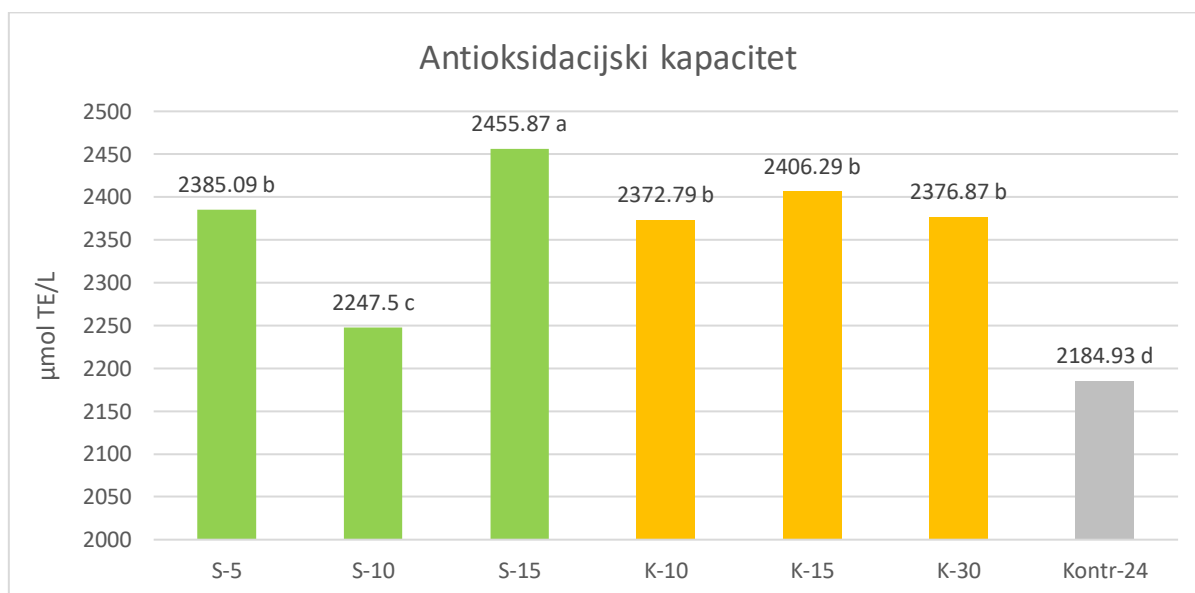
Grafikon 19. Sadržaj ukupnih karotenoida (µg/g) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

4.2.4. Antioksidacijski kapacitet

Općenito, antioksidativno djelovanje izravno je povezano sa sadržajem vitamina, minerala, fenolnih spojeva, pigmenata i ostalih bioaktivnih spojeva. To znači da će uzorci s većim sadržajem bioaktivnih spojeva imati i veće antioksidativno djelovanje (Brnčić i Šić Žlabur, 2019). Sulaiman i sur. (2017) utvrdili su pozitivno djelovanje ultrazvuka na antioksidacijski kapacitet. U uzorcima soka od jabuke utvrđene su 20% veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s uzorkom koji je ekstrahiran klasičnom metodom. Bhat i sur. (2011) dokazali su povećanje antioksidacijskoga kapaciteta za 35% uporabom ultrazvuka kao načina ekstrakcije u uzorcima soka od limete.

Grafikon 20 prikazuje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta alkoholnih ekstrakata praha koprive. Najveća zabilježena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta iznosi 2455,87 µmol TE/L, a utvrđena je za uzorak tretiran ultrazvučnom sondom u trajanju od 15 min (S-15), dok je najniža zabilježena vrijednost 2184,93 µmol TE/L utvrđena za kontrolni uzorak, odnosno uzorak u kojemu je prah ekstrahiran klasično (Kontr-24). Uspoređujući uzorke tretirane

ultrazvučnom sondom, neovisno o vremenu trajanja tretmana, i uzorak ekstrahirani klasično može se utvrditi kako je antioksidacijski kapacitet veći u ekstraktima tretiranim sondom za oko 8%. S druge strane, kod uzoraka tretiranih u kupelji, neovisno o vremenu trajanja tretmana, utvrđen je porast vrijednosti i to za oko 9% u odnosu na kontrolni uzorak. Uspoređujući uzorke s obzirom na tip uređaja (sonda i kupelj), neovisno o vremenu tretiranja, utvrđen je porast vrijednosti no tek za oko 1% kod uzoraka ekstrahiranih sondom. Vrijeme tretmana također je značajno utjecalo na antioksidacijski kapacitet uzoraka tretiranih sondom te se općenito može utvrditi kako je dulje vrijeme tretiranja sondom (S-15) pozitivno utjecalo na antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati u sklopu ovog istraživanja očekivani su i u skladu s drugim literaturnim navodima, a koji dokazuju pozitivan utjecaj ultrazvuka na polifenolne spojeve, a time i na antioksidacijski kapacitet nekog uzorka (Šic Žlabur i sur., 2015; Šic Žlabur i sur., 2017).



Grafikon 20. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$) alkoholnih ekstrakata praha koprive tretiranih UZV sondom (5 min S-5; 10 min S-10 i 15 min S-15), UZV kupelji (10 min K-10; 15 min K-15 i 30 min K-30) i uzorka kontrole ekstrahiranog klasičnom metodom (Kontr-24)

5. Zaključak

Na temelju rezultata dobivenih u okviru ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Upotreba ultrazvuka pozitivno je utjecala na sve analizirane fizikalno-kemijske parametre alkoholnih ekstrakata koprive, uz izuzetak gustoće, za koju nisu utvrđene razlike ovisno o tretmanu (ultrazvuk i klasično) kao i tipu uređaja (sonda i kupelj) te vremenu tretmana. Promatrajući kromatske parametre, primijećeno je da su uzorci tretirani ultrazvučnom sondom, duljim vremenskim periodom tretmana, potamnili za razliku od uzoraka tretiranih u kupelji koji su posvijetlili. Najsvjetliju zelenu boju imao je uzorak ekstrahiran klasičnim načinom, odnosno kontrolni uzorak. Može se zaključiti kako su ultrazvuk i vremensko razdoblje provođenja tretmana značajno utjecali na degradaciju L^* i a^* vrijednosti, a samim time i na promjenu boje alkoholnih ekstrakata koprive.
- Ovim istraživanjem utvrđeno je da na specijalizirane metabolite najbolji učinak pokazuje tretman ultrazvučnom sondom u vremenskom periodu od 15 minuta, uz izuzetak sadržaja ukupnih neflavonoida, na koje tretman ultrazvučnom sondom pokazuje najbolji učinak u vremenskom periodu od 10 minuta. Uporaba ultrazvuka pridonijela je očuvanju i povećanju sadržaja specijaliziranih metabolita, i to: sadržaja vitamina C, ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida, klorofila a i b, ukupnih klorofila te sadržaja ukupnih karotenoida u pripremljenim alkoholnim ekstraktima (tinkturama) praha koprive.
- Za sadržaj klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida utvrđene su razlike ovisno o tretmanu (ultrazvuk i klasično) kao i o tipu uređaja (sonda i kupelj). Najveće vrijednosti zabilježene su kod tretmana ultrazvučnom sondom u vremenskom periodu od 15 minuta.
- Ultrazvučna ekstrakcija imala je pozitivan utjecaj na antioksidacijski kapacitet alkoholnih ekstrakata praha koprive te su najveće vrijednosti zabilježene pri tretmanu ultrazvučnom sondom u vremenskom periodu od 15 minuta.

Na kraju može se istaknuti kako su svi analizirani alkoholni ekstrakti praha koprive bogatog sadržaja specijaliziranih metabolita, a time i snažnog nutritivnog potencijala te bi njihova uporaba mogla doprinijeti očuvanju ljudskog zdravlja i prevenciji raznih oboljenja. Isto tako važno je naglasiti da ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva ima brojne prednosti u odnosu na klasičnu tehniku. Jedna od tih je da u vrlo kratkom vremenskom periodu dovodi do povećanja sadržaja različitih bioaktivnih spojeva.

6. Literatura

1. Aadil R. M., Zeng X.-A., Ali A., Zeng F., Farooq M. A., Han Z., Jabbar S. (2015). Influence of different pulsed electric field strenghts on the quality of the grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(10), 2290-2296
 2. Aadil R.M., Zeng X.-A, Han Z., & Sun D.,-W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201-3206
 3. Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M. M., Hu Bu., Lei S., Zeng X., (2013). Effect of ultrasound of different quality parameters apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182-1187.
 4. Adekunte A.O., Tiwari B.K., Cullen P.J., Scannell A.G.M., & O'Donnell C.P.(2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.
 5. Alighourchi H.R., Barzegar M., Sahari M.A., Abbasi S. (2013). Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant capacity of pomegranate juices. *International Food Research Journal*, 20(4), 1703-1709.
 6. AOAC (1995). *Official methods of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of official Analytical chemists.
 7. Berend S., Grabari Z. (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow – injection method. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 59: 205-12.
 8. Bhat R., Kamaruddin N.S.B.C., Min-Tze L. & Karim A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295-1300.
 9. Brnčić M., Šic Žlabur J. (2019). Impact of ultrasound on food constituents. Effect of Emerging Processing Methods on the Food Quality. pp 69-94.
 10. Carović-Stanko K. (2021). Tinktura koprive protiv opadanja kose. *Gospodarski list* <https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/tinktura-od-koprive-protiv-opadanja-kose> pristup: 04.08.2021.
 11. Carović-Stanko K., Vidak M. (2021). Priprema ljekovitih čajeva i tinktura. *Gospodarski list* <https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/priprema-ljekovitih-cajeva-i-tinktura/> pristup: 13.09.2021.
- Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT- Food Science and Technology*, 41 (10), 1876-1883.

12. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology, 2(2): 22-33.
13. Đurović S., Pavlić B., Šorgić S., Popov S., Savić S., Petronijević M., Radojković M., Cvetanović A., Zeković Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. Journal of functional foods. 32 (2017) 18-26
14. Eduka. Kopriva. <https://eduka.hr/kopriva/> pristup 21.08.2021.
15. Esposito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Isernia, C., Pedone, P.V. (2019). Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. Food Bioactive: Chemical Challenges and Bio-Opportunities. 24 (15), 2753
16. Ferruzzi G. M., Schwartz J. S. (2001) Overview of chlorophylls in foods. Current Protocols Food Anal. Chem. F4.1.1.- F4.1.9
17. Flora croatica database. *Urtica dioica*. <https://hirc.botanic.hr/fcd/> pristup 20.08.2021.
18. Golenčir J., Golenčir J., (1991). Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb.
19. Herceg Z., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S., Krešić G. (2008). Procesi konzerviranja hrane: novi postupci. Zagreb: Golden marketing- Tehnička knjiga. Zagreb
20. Joshi, B., Mukhija, M., Kalia, A. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. Int. J. of Green Pharm. 16: 201-207.
21. Jurčić B. (2019). Učinak biostimulatora rasta na morfološke pokazatelje i kemijski sastav koprive. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb
22. Jurković M. (2019). Optimizacija ekstrakcije polifenolnih spojeva i pigmenata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.) primjenom ultrazvuka. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb.
23. Kregiel, D., Pawlikowska, E., Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. Molecules, 23, 1664
24. Kruk V., Jurković., Repajić M., Žutić I., Dragović-Uzelac V., Zorić Z. (2019). The influence of ultrasound assisted extracion on the isolation of bioactive compounds from nettle leaves. Book of Abstracts on 1st International Conference on Advanced Production and Processing. Novi Sad, Srbija
25. Kulcu R. (2018). Determination of the effects of different packaging methods and materials on storage time of dried apple Matter. International Journal of Science and Technology, 4: 238-255.

26. Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4): 407- 412.
27. Nowacka M., Wiktor A., Śledź M., Jurek N., & Witrowa-Rajchert D. (2012). Drying of ultrasound pretreated apple and its selected physical properties. *Journal of Food Engineering*, 13(3), 427-433.
28. Ordoñez-Santos L.G., Martínez-Girón J., Arias-Jaramillo M.E. (2017). Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*, 233:96-100.
29. Ough C. S., Amerine M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*, Washington, USA: John Wiley&Sons.
30. Ough C. S., Amerine M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*, Washington, USA: John Wiley&Sons.
31. Petrović A. (2018). Sva zaštitna svojstva karotenoida. <https://naturalwealth.com.hr/zivjeti-zdravije/iz-prirode-zdravlje/sva-zastitna-svojstva-karotenoida-13/> pristup 04.08.2021.
32. Radman S. (2015). Utjecaj gnojidbe dušikom i načina uzgoja na kemijski sastav dvodomne koprive (*Urtica dioica* L.). Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
33. Radman S., Žutić I., Fabek S., Šic Žlabur J., Toth N., Čoga L. (2015) Influence of nitrogen fertilization on chemical composition of cultivated nettle. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2015. 27(12): 889-896.
34. Rafajlovska V., Kavrakovski Z., Simonovska J., Srbinska M. (2013). Determination of protein and mineral contents in stinging nettle
35. Rafajlovska V., Rizova V., Djarmati Z., Tesevic V., Cvetkov Lj. (2001). Contents of fatty acids ins stinging nettle extracts (*Urtica dioica* L.) obtained supercritical carbon dioxide. *Acta pharmaceutica* (Zagreb). Vol 51, Num 1, pp 45-51.
36. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.

37. Sulaiman A., Farid M., Silva F.V., (2017),.Quality stability and sensory attributes of apple juice processed by thermosonication, pulsed electric field and thermal processing. Food Science and Technology International, 23(3), 265-276.
38. Šic Žlabur J. (2015). Utjecaj bioaktivnih komponenata stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) na kvalitetu voćnog soka. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
39. Šic Žlabur,J. Brajer M.,; Voća S., Galić A., Radman S., Rimac Brnčić S., Qiang X., Zhenzhou Z.,Nabil G., Barba F.J.,Hulak N. (2021). Ultrasound as a Promising Tool for the Green Extraction of Specialized Metabolites from Some Culinary Spices. Molecules, 26 7;1866, 15.
40. Šic Žlabur J., Dobričević N., Plietić S., Galić A., Bilić D. P., Voća S. (2017). Antioxidant potential of fruit juice with added chokeberry powder (*Aronia melanocarpa*). Molecules, 22(12).
41. Šic Žlabur J., Voća S., Brnčić M., Rimac-Brnčić S. (2018). New Trends in Food Technology for Green Recovery of Bioactive Compounds From Plant Materials. Role of Materials Science in Food Bioengineering. Handbook of Food Bioengineering, 1-36.
42. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N. (2016). Kvaliteta voća, povrća i prerađevina - priručnik za vježbe. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet Zagreb
43. Tiwari B.K., Muthukumarappan K., O'Donnell C.P., & Cullen P. J. (2008)
44. Voća S., Dobričević N., Šic Žlabur J. (2011). Priručnik za vježbe iz modula Prerada voća i povrća. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet Zagreb
45. Zou Y., Jiang A. (2016). Effect of ultrasound treatment on quality and microbial load of carrot juice. Food Science and Technology, 36(1): 111-115.

Životopis

Anamaria Rašić rođena je 11.07.1997. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je 2012. godine u Zagrebu (Osnovnu školu Marije Jurić Zagorke), a srednju 2016. godine u Zagrebu (IX. Gimnazija Zagreb). Iste godine upisuje preddiplomski studij Hortikultura na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Prediplomski studij završava obranom završnog rada u rujnu 2019. godine na temu „Mikroklimat trsa vinove loze i njegov utjecaj na kakvoću grožđa i vina“ te stiče naziv Sveučilišna prvostupnica inženjerka hortikulture. Nakon toga nastavlja obrazovanje na Agronomskom fakultetu, diplomski studij Hortikultura-Povrćarstvo.