

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz lista planike (*Arbutus unedo* L.)

Škrinjar, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:334225>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Nina Škrinjar

**ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA
EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
LISTA PLANIKE (*Arbutus unedo* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć dr. sc. Anice Bebek Markovinović.

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu

PRIMA Projekt „From Edible Sprouts to Healthy Food – Feed“ (Prima Call 2022, Prima Section 2 – Multi Topic 2022, Topic 2.3.1 (RIA) Enabling the transition to healthy and sustainable dietary behaviour)



Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

ZAHVALA

Hvala ti Bože što si mi pomogao da postignem uspjeh u području koje me zanima i ostvarim svoj cilj.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima koji su me podržavali na sve moguće načine kako bih uspjela, hvala vam na svojoj ljubavi i strpljenju, na riječima ohrabrenja kada su one bile potrebne, na pomoći i razumijevanju, puno vas volim.

Draga sestro, drage moje Lucija, Lana, Lorena i Ana, puno vam hvala na svim trenucima koje smo proživjele, hvala za svako druškanje, vijećanje, nasmijavanje, izlazak, utjehu i potporu. Vi ste najbolje prijateljice na svijetu. Ne bih uspjela bez našeg prijateljstva.

Dragi Andrej, vjerojatno to ne znaš, ali teže je bilo tebe osvojiti nego završiti faks hahaha. Hvala ti na strpljenju, podršci, razumijevanju i vjeri u mene. Jako sam sretna i zahvalna što te imam uz sebe.

Hvala dr. sc. Anici na svim iznenadnim terminima konzultacija, pomoći u izradi, razgovorima punima utješnih riječi i prijateljskih savjeta.

Draga mentorice, hvala Vam na uloženom vremenu i trudu, na svim pruženim prilikama, savjetima i pohvalama, neizmjereno sam sretna što sam imala priliku izraditi diplomski rad pod Vašim mentorstvom. Nadam se da ću, poput Vas, u životu živjeti svoj san.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA PLANIKE
(*Arbutus unedo* L.)

Nina Škrinjar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215521

Sažetak: Obična planika (*Arbutus unedo* L.) važna je biljna vrsta za očuvanje ekosistema mediteranske regije, dokazanog biološkog i medicinskog značaja, no nedovoljno iskorištena u preradi te proizvodnji funkcionalne hrane. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj varijabilnih procesnih parametara tijekom ekstrakcije provedene ultrazvukom iz uzoraka lista planike na prinos bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet. Ispitivan je utjecaj promjera sonde (7 mm, 14 mm, 22 mm), amplitude (50 %, 100 %), pulsa (50 %, 100 %) i vremena ekstrakcije (5 minuta, 10 minuta). U ekstraktima su spektrofotometrijski određeni ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli i polimerni proantocijanidini te antioksidacijski kapacitet primjenom tri različite metode. Najveći prinos navedenih spojeva određen je pri najin vazivnijim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije. Ipak, procesni parametri ultrazvučne ekstrakcije nisu pokazali utjecaj na vrijednosti ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. Zaključno, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija može se primijeniti za ekstrakciju visokovrijednih bioaktivnih spojeva sa značajnim antioksidacijskim potencijalom iz lista planike.

Ključne riječi: ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, list planike, bioaktivni spojevi, prinos ekstrakcije, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 69 stranica, 11 slika, 2 tablica, 132 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

Pomoć pri izradi: dr. sc. Anica Bebek Markovinović.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Senka Djaković (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Dent (član)
4. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić (zamjenski član)

Datum obrane: 25. studenog 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM STRAWBERRY
TREE LEAVES (*Arbutus unedo* L.)

Nina Škrinjar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215521

Abstract: The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is an important plant for preserving the Mediterranean ecosystem, with proven biological and medicinal significance; however, it remains underutilized in functional food processing. Therefore, the aim of this study was to examine the effect of processing parameters during ultrasound-assisted extraction (UAE) from strawberry tree leaf samples on the yield of bioactive compounds and antioxidant capacity. The study investigated the effects of probe diameter (7 mm, 14 mm, 22 mm), amplitude (50%, 100%), pulse (50%, 100%), and extraction time (5 minutes, 10 minutes). In the extracts, total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, flavonols, and polymeric proanthocyanidins were spectrophotometrically determined, along with antioxidant capacity using three different methods. The highest compounds yield occurred under intensive extraction conditions, though these parameters didn't affect total antioxidant capacity. In conclusion, UAE can be effectively applied to extract high-value bioactive compounds with significant antioxidant potential from strawberry tree leaves.

Keywords: ultrasound-assisted extraction, strawberry tree leaves, bioactive compounds, extraction yield, antioxidant capacity

Thesis contains: 69 pages, 11 figures, 2 tables, 132 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Anica Bebek Markovinović, PhD

Reviewers:

1. Senka, Djaković, PhD, Full professor (president)
2. Danijela, Bursać Kovačević, PhD, Full professor (mentor)
3. Maja, Dent, PhD, Associate professor (member)
4. Jasmina, Lapić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: November 25th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ZNAČAJ PLANIKE (<i>Arbutus unedo</i> L.) KAO BILJNE VRSTE.....	2
2.2. NUTRITIVNI SASTAV LISTA PLANIKE	2
2.3. FITOKEMIJSKI SASTAV LISTA PLANIKE.....	3
2.4. BIOLOŠKA, FARMAKOLOŠKA I NUTRITIVNA SVOJSTVA LISTA PLANIKE	5
2.5. NAPREDNE TEHNOLOGIJE EKSTRAKCIJE U IZOLACIJI BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA	7
2.6. TEHNOLOGIJA ULTRAZVUKA U EKSTRAKCIJI – PRINCIP I MEHANIZAM DJELOVANJA.....	8
2.6.1. Tehnologija ultrazvuka u ekstrakciji bioaktivnih spojeva.....	10
2.6.2. Neki čimbenici od značaja pri ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. UZORAK LISTA PLANIKE	16
3.2. METODE RADA.....	17
3.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija	17
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	19
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida	21
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidrokscimetnih kiselina i flavonola.....	2324
3.2.5. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom	26
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) metodom	28
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) metodom	3034
3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH) metodom	32
3.3. OBRADA REZULTATA	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE	35
4.2. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FLAVONOIDA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE	39
4.3. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH HIDROKSCIMETNIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE	42
4.4. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FLAVONOLA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE	45

4.5. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH POLIMERNIH PROANTOCIJANIDINA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE.....	48
4.6. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN FRAP METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE.....	51
4.7. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN ABTS METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE.....	54
4.8. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN DPPH METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE.....	57
5. ZAKLJUČCI.....	60
6. LITERATURA.....	61

1. UVOD

U današnje vrijeme, velika pažnja posvećuje se dobrobiti i zdravlju ljudi, stoga se u farmaceutskoj, prehrambenoj i nutraceutskoj industriji javlja sve veći interes za istraživanje bioaktivnih spojeva (Shen i sur., 2023). Biljka obična planika (*Arbutus unedo* L.) posjeduje aromatična i ljekovita svojstva, zbog kojih se tradicionalno sakuplja od davnih dana diljem Mediterana (Gomez i sur., 2010). Kao voćna vrsta, smatra se nedovoljno istraženom, a posjeduje potencijal za različite komercijalne namjene poput proizvodnje svježeg voća i preradevina, primjene u pčelarstvu, pošumljavanju, te farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji (Miguel i sur., 2014). Usporedbom bioaktivnog sastava plodova i lista planike, veći udio polifenolnih spojeva posjeduje list planike. Također, u listu su identificirani spojevi koji nisu prisutni u plodovima voća. U sastavu lista velika je zastupljenost hranjivih tvari kao i bioaktivnih spojeva raznovrsnih bioloških aktivnosti, stoga se list kao takav može razmatrati kao perspektivna sirovina u proizvodnji funkcionalne hrane i nutraceutika (Bebek Markovinović i sur., 2020).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija inovativna je tehnologija u obradi hrane, istaknuta i kao ekološki prihvatljiva metoda izolacije bioaktivnih spojeva, koja ima potencijal za minimiziranje ili eliminaciju korištenja organskih otapala. Smanjeni prinos ekstrakcije, niža učinkovitost procesa te upotreba značajnih količina otapala ili resursa neke su od negativnih strana primjene tradicionalnih ekstrakcijskih tehnika. Također, pojedine tradicionalne metode ekstrakcije zahtijevaju visoke temperature, što može rezultirati degradacijom i gubitkom termolabilnih bioaktivnih spojeva, te je potrebno duže vrijeme ekstrakcije i veći utrošak energije (Shen i sur., 2023). Stoga su inovativne tehnike poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom područje od interesa mnogim istraživačima jer nude mogućnost unaprjeđenja kvalitete i kvantitete izoliranih bioaktivnih spojeva iz različitih materijala, uz ekonomičnije vođenje procesa. Najveća učinkovitost može se postići optimizacijom parametara procesa koji ovise o specifičnim karakteristikama uzoraka. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj parametara ultrazvukom potpomognute ekstrakcije kao što su promjer sonde, amplituda, puls i vrijeme ekstrakcije na prinos bioaktivnih spojeva iz ekstrakata lista *Arbutus unedo* L. te ukupnog antioksidacijskog kapaciteta istih. Na temelju dobivenih rezultata utvrđene su vrijednosti procesnih parametara koji najpovoljnije utječu na ekstrakciju fenolnih spojeva, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i kondenziranih tanina te ukupni antioksidacijski kapacitet primjenom tri metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZNAČAJ PLANIKE (*Arbutus unedo* L.) KAO BILJNE VRSTE

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) prvi put je opisana 1753. godine u dijelu "Species Plantarum" poznatog botaničara Carla Linnaeusa, a dodijeljeni latinski naziv biljke koristi se i u današnje vrijeme (Linnaei, 1753). Planika je vazdazeleno, grmolika biljka iz porodice Ericaceae koja stvara arbutoidnu mikorizu s određenim vrstama gljiva (Giovannetti i Lioi, 1990). Listovi planike su karakteristične tamnozeleno boje, kožasti, naizmjenično poredani, jednostavnog oblika s nazubljenim rubovima i kratkim peteljka. Plod ove zimzelene biljke naziva se maginja, okruglog je oblika, a boja varira od zelenih, narančastih do crvenih tonova. Za cvjetanje stabla potreban je vremenski period od 12 mjeseci, pri čemu su cvjetovi bijelo-ružičaste boje. Plodovi sazrijevaju u vremenskom razdoblju od kraja rujna/sredine listopada do početka prosinca nekoliko puta godišnje, stoga je moguća istovremena cvatnja stabla i dozrijevanje plodova (Jurica, 2016). Zbog iznimne nutritivne vrijednosti, plod maginje zastupljen je u prehrani ljudi na prostorima gdje biljka prirodno obitava: europske zemlje oko Sredozemnog mora, atlantska regija zapadne Europe uključujući i Irsku, sjeveroistočna Afrika uključujući Libiju i Egipat, zapadna Azija te Kanarski otoci. Klimatski uvjeti povoljni za rast biljke su područja gdje nema intenzivnog, suhog, ljetnog zraka, kao ni učestale pojave mraza u hladnijim mjesecima (Miguel i sur., 2014). Obična Planika je samonikla biljka, zastupljena u Republici Hrvatskoj kao sastavni dio vegetacije šuma *Quercus ilex* L. i makije, duž obale Jadranskog mora (Trinajstić, 2008). Zahvaljujući blagodatni plodova i lišća, biljka se koristi u narodnoj medicini kako bi se otklonili bubrežni i urološki problemi, te ublažile gastrointestinalne, dermatološke i kardiovaskularne bolesti. Što se tiče prehrambenog područja, plodovi maginje prerađuju se u žele, džem i jaka alkoholna pića, a listovi se upotrebljavaju za pripravak čaja (Bebek Markovinović i sur., 2020). Na temelju provedenih istraživanja utvrđeno je da list ima znatno veći udio polifenola u svom sastavu s obzirom na plod biljke (Bebek Markovinović i sur., 2020). Štoviše, u listu su identificirani spojevi poput arbutina, flavonoidnih aglikona (naringenin, miricetin, morin, kaempferol) i fenolnih kiselina (klorogenska i protokatehuinska kiselina) koji nisu detektirani u plodu maginje (Brčić Karačonji i sur., 2022).

2.2. NUTRITIVNI SASTAV LISTA PLANIKE

Ukupan udio suhe tvari lista iznosi od 51 % do 92 %, a raspon ukupne kiselosti iznosi od 0,7 % do 1,9 %. Ovisno o klimi i području na kojem biljka uspijeva, kiselost lista je visoka te može varirati u pH rasponu od 3,89 do 5,35 (Šic Žlabur i sur., 2020). Iz skupine terpenoida, u

sastavu lista prevladavaju: betulinska kiselina, lupeol i amirin acetat (Barros i sur., 2010). Vitamin C i α -tokoferol najzastupljeniji su iz skupine vitamina, a istraživanja u Hrvatskoj pokazala su da se udio vitamina C razlikuje u sastavu lista maginje, ovisno o području Jadranske obale na kojem je list ubran. Raspon iznosi od 61,61 do 333,83 mg na 100 g⁻¹ svježeg uzorka (engl. *fresh weight, FW*) (Šic Žlabur i sur., 2020). Asmaa i sur. (2019) utvrdili su sličan sastav makroelemenata i mikroelemenata u plodu i listu *A. unedo*, od kojih su najzastupljeniji od makroelemenata kalij u koncentraciji 1743 mg na 100 g⁻¹ suhog materijala (engl. *dry weight, DW*) i kalcij koncentracije 1299 mg na 100 g⁻¹ DW, a željezo je najzastupljeniji od mikroelemenata. Asmaa i sur. (2019) navode da se, od hlapljivih spojeva u listu, u najvećim koncentracijama nalaze: kamfor (43,5 %), α -fenhon (17,5 %), bornil acetat (16,0 %), eukarvon (3,16 %) i mirtenil acetat (3,16 %). Istraživanje koje su proveli Kivack i sur. (2001) pokazalo je da su najzastupljeniji hlapljivi spojevi: (*E*)-2-decenal (12,0 %), α -terpineol (8,8 %), heksadekanska kiselina (5,1 %) i (*E*)-2-undecenal (4,8 %). Mogući razlozi zbog kojih je došlo do razlike u rezultatima prilikom određivanja sadržaja su postupak ekstrakcije uzorka i različito područje uzgoja lista (Berka-Zougali i sur., 2010). Rezultati u određivanju zastupljenosti masnih kiselina u listu *A. unedo* također su se razlikovali. Koukos i sur. (2015) naveli su da sadržajem dominira linolenska (44,2 %), a slijede palmitinska (25,5 %) i linolna kiselina (7,9 %). Dib i sur. (2010) ispitivanjem su dobili poredak zastupljenosti: palmitinska (38,5 %), oleinska (10,6 %), linolenska (9,3 %) i linolna kiselina (5,5 %). S obzirom na klimu i geolokaciju, koncentracija karotenoida u uzorcima kretala se u rasponu od 0,06 do 0,27 mg g⁻¹, a koncentracija klorofila od 0,19 do 2,37 mg g⁻¹ (Šic Žlabur i sur., 2020). Koncentracija antocijana u listu planike iznosila je, s obzirom na korišteno otapalo i postupak ekstrakcije, od 0,33 do 0,8 mg cijanidin-3-glukozida po gramu ekstrakta (Kachkoul i sur., 2019). S obzirom da listovi i plodovi biljke *A. unedo* obiluju hranjivim tvarima i bioaktivnim spojevima raznovrsnih bioloških aktivnosti, mogu se razmatrati kao perspektivna sirovina za formulaciju funkcionalne hrane, nutraceutika te njihovog razvitka (Bebek Markovinović i sur., 2020).

2.3. FITOKEMIJSKI SASTAV LISTA PLANIKE

Prema istraživanju Oliveira i sur. (2009) dobivena vrijednost sadržaja ukupnih fenola u ekstraktu lista maginje iznosila je 192,66 miligrama ekvivalenta galne kiseline po gramu materijala (engl. *Gallic acid equivalent, GAE*). Mendes i sur. (2011) odredili su da ukupan sadržaj fenola lista maginje iznosi 170,3 mg GAE g⁻¹. Rezultati određivanja Brčić Karačonji i sur. (2022) iznosili su od 67,07 do 104,74 mg GAE g⁻¹ DW. Bouyahya i sur. (2016) izvijestili su da ukupni fenoli iznose, ovisno o primijenjenoj vrsti otapala, od 94,51 do 141,726 mg GAE g⁻¹ ekstrakta. Šic Žlabur i sur. (2020) dobili su rezultate sadržaja ukupnih fenola u rasponu od 18,69 do 26,94 mg GAE g⁻¹ FW, a Martins i sur. (2021) u rasponu od 254,96 do 495,24 mg

g⁻¹ lišća FW. U listu se, od polifenolnih spojeva, u najvišim koncentracijama nalaze: arbutin 62,7 mg 100 g⁻¹ FW, etil galat 44 mg 100 g⁻¹ FW i katehin 54,6 mg 100 g⁻¹ FW (Fiorentino i sur., 2007) (tablica 1). Ostali zastupljeni polifenoli su flavonoidi (rutin, katehin galat, afzelin, avikularin, miricetin, juglanin), tanini, iridoidni glukozidi i fenolni glikozidi (hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin) (Carcache-Blanco i sur., 2006; Leggsyer i sur., 2004; Males i sur., 2006; Sanjust i sur., 2008). U listu nije detektiran bioaktivan metabolit arbutina hidrokinon (de Falco i sur., 2022). Detaljni profili fenola u listovima *A. unedo* utvrđeni su posljednjih nekoliko godina zahvaljujući poboljšanju i razvoju analitičkih tehnika. U vodenim i metanolnim ekstraktima lišća identificirano je 60 fenola uporabom tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti (UHPLC) povezanom s masenim spektrometrom (LTQ Orbitrap MS) (Bebek Markovinović i sur., 2020). U listovima maginje, podrijetlom sa Sardinije, identificirano je 19 fenola u etanolnim ekstraktima tehnikom UHPLC povezanom s hibridnim masenim spektrometrom. Derivati miricetina, kaempferol i kvercetin skupina su flavonoida koji su detektirani kao najzastupljeniji fenoli u navedenom ispitivanju (Maldini i sur., 2019). Uporabom tekućinske kromatografije u kombinaciji s kvadropolnim masenim spektrometrom vremena leta (LC-QTOF-MS) otkriveno je 37 bioaktivnih spojeva od kojih sadržajem dominiraju: iridoidi, fenolne kiseline, flavonoidi i proantocijanidini (Tenuta i sur., 2020). Jurica i sur., (2017) odredili su u listu maginje ukupnu količinu flavonoida, izraženu u % kvercetina, u rasponu od 0,52 do 2,14 % te ukupnu količinu fenolne kiseline, izraženu u % ružmarinske kiseline, koja je iznosila 1,48 %. Uz određivanje ukupnih fenola, provedena su brojna istraživanja u kojima se određivala ukupna koncentracija poznatijih antioksidansa: tanina, vitamina E (tokoferoli u sjemenkama), flavonoida i fenolnih kiselina (Brčić Karačonji i sur., 2022; Oliveira i sur., 2011; Vidrih i sur., 2013). Na temelju fitokemijskog profiliranja, antocijani, karotenoidi, masne kiseline, terpenoidi, flavonoidi i iridoidi, predstavljaju glavne skupine bioaktivnih spojeva u lišću i plodovima planike (Tenuta i sur., 2020). Međutim, prema podacima iz literature, istraživanja usmjerena na list opsežnija su od istraživanja kojima je u fokusu plod planike (Bebek Markovinović i sur., 2020). U pogledu ukupnog sadržaja fenola, dobiven je široki raspon vrijednosti, a razlog tome su različite metode ekstrakcije i otapala koja se koriste prilikom određivanja te klimatski uvjeti područja s kojeg je planika uzeta (Brčić Karačonji i sur., 2022; Tenuta i sur., 2020; Oliveira i sur., 2009; Malheiro i sur., 2012).

Tablica 1. Prikaz koncentracija ukupnih fenola i polifenolnih spojeva u najvišim koncentracijama u listu *A. unedo*

Bioaktivna sastavnica	Koncentracija	Referenca
Ukupni fenoli	192,66 mg GAE g ⁻¹	Oliveira i sur. (2009)
	170,30 mg GAE g ⁻¹	Mendes i sur. (2011)
	67,07 – 104,74 mg GAE g ⁻¹ DW	Brčić Karačonji i sur. (2022)
	94,51 – 141,726 mg GAE g ⁻¹	Bouyahya i sur. (2016)
	18,69 – 26,94 mg GAE g ⁻¹ FW	Šic Žlabur i sur. (2020)
	254,96 – 495,24 mg g ⁻¹ FW	Martins i sur. (2021)
Arbutin	62,7 mg 100 g ⁻¹ FW	Fiorentino i sur. (2007)
Etil galat	44 mg 100 g ⁻¹ FW	
Katehin	54,6 mg 100 g ⁻¹ FW	

GAE- ekvivalent galne kiseline; DW- suha tvar uzorka; FW- svježi uzorak

2.4. BIOLOŠKA, FARMAKOLOŠKA I NUTRITIVNA SVOJSTVA LISTA PLANIKE

Karakteristika polifenolnih spojeva jest jaka antioksidacijska moć protiv oksidacijskog stresa, koji je posljedica djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta. Iz tog razloga nužno je određivanje ukupne koncentracije fenola, kako bi se odredila svojstva biljke s učinkom na zdravlje (Brčić Karačonji i sur., 2022; Oliveira i sur., 2011; Vidrih i sur., 2013). Jurica i sur. (2017) utvrdili su da sadržaj tanina u listovima planike iznosi 83 % od ukupnih fenola, što se može povezati sa snažnom antioksidacijskom aktivnošću lista, s obzirom da tanini u svojoj strukturi sadrže velik broj galoilnih i hidroksilnih skupina. Smatra se da je aktivnost tanina povezana sa smanjenom adhezijom trombocita (koagulacija) prilikom tretiranja ljudskih trombocita sa sirovim vodenim ekstraktima lišća. Dodatkom ekstrakta rastuće koncentracije od 0,015 do 1,5 mg mL⁻¹ primijećena je smanjena agregacija trombocita izazvana trombinom. Smanjena agregacija trombocita ovisna je o dodanoj koncentraciji ekstrakta i važan je faktor u patogenezi upalnih bolesti (EL Haouari i sur., 2007). Spojevi iz skupine flavonoida razlikuju se po svojoj kemijskoj aktivnosti, npr. flavonoli: rutin, kvercetin, kveriktrin i miricetin imaju tendenciju hvatanja slobodnih radikala, dok katehin ima sposobnost keliranja s metalima, što suzbija nastajanje slobodnih radikala. Fenolne kiseline, s obzirom na položaj i broj hidrofilnih

skupina te metoksi skupina na molekuli, također reagiraju sa slobodnim radikalima (Huang i sur., 2009). Prilikom *ex vivo* studije na izoliranoj aorti štakora, dodan je ekstrakt lišća planike u koncentraciji 0,01 g L⁻¹. Uočena su snažna vazodilatatorska svojstva ekstrakta te pozitivan utjecaj na kardiovaskularno zdravlje koja se pripisuju prisustvu katehin galata i kondenziranih tanina (Legssyer i sur., 2004). Štoviše, primijećena je i inhibicija enzima odgovornog za reumatoidni artritis, proliferaciju tumorskih stanica i metastaza, što je povezano s derivatima galne kiseline (Tavares i sur., 2010). Posebnu antibakterijsku aktivnost protiv vrsta *Enterococcus* pokazao je spoj arbutin (Jurica i sur., 2017; Jurica i sur., 2018a). U usporedbi s listom medvjette (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), koji količinski sadrži više arbutina od planike, uočen je jednak mehanizam djelovanja. Antimikrobna aktivnost arbutina uvjetovana je aktivnošću izvanstaničnog enzima β-glukozidaze koji katalizira reakciju pretvorbe arbutina u slobodni hidrokinon, odgovoran za antimikrobni učinak (Jurica i sur., 2017). Ekstrakti lista *A. unedo* eliminirali su rast *Crataegus lucitaniae*, *Candida tropicalis*, parazita *Leishmania* i brojnih mikobakterija (Coimbra i sur., 2020; El Haouari i sur., 2021). Etanolnom ultrazvučnom ekstrakcijom, pri čemu je koncentracija potrebna za inhibiciju 50 % populacije IC₅₀ 19,56 mg L⁻¹ (engl. *half maximal inhibitory concentration, IC₅₀*), i maceracija vodenom otopinom etanola, IC₅₀ 19,56 mg L⁻¹, dobiveni su ekstrakti svježih listova. Inhibicijom probavnog enzima β-glukozidaze, zaduženog za apsorpciju ugljikohidrata, ekstrakti lišća pokazivali su hipoglikemijsko djelovanje (Tenuta i sur., 2020). Infuzijom lišća *in vitro* uočena je litolitička aktivnost prema kamencima sačinjenim od kalcijeva oksalata (Kachkoul i sur., 2019). Na brojnim tumorskim linijama ispitan je citotoksični učinak ekstrakta lišća, a na izoliranim ljudskim limfocitima ispitivao se citoprotektivni učinak. Primjenom ekstrakta planike s vodenom otopinom etanola na ljudske osteosarkomske stanice U2OS došlo je do blokiranja G2/N faze staničnog ciklusa, što ukazuje na citostatičke učinke s obzirom da nije došlo do apoptotičke smrti stanice. Citotoksičnost ekstrakta zabilježena je tijekom ispitivanja na endotelnim stanicama ljudske pupčane vene (HUVEC) (Cappadone i sur., 2019). Također, ekstrakt proteina planike inhibirao je stanice raka debelog crijeva HT29 (Oliveira i sur., 2019). Vodeni ekstrakti lista *A. unedo* korišteni su za *in vitro* procjenu sigurnosti na limfocitima, u trajanju od 24 sata. Ispitivanje je pokazalo da koncentracije, koje odgovaraju maksimalno dopuštenom dnevnom unosu arbutina, onemogućuju citotoksične učinke. Štoviše, zbog onemogućavanja transformacija mikronukleusa u limfocitima, javlja se zanemariva mogućnost induciranja primarnih oštećenja DNA (Jurica i sur., 2018b). U pogledu biološke aktivnosti lišća, evidentirana su svojstva *A. unedo* koja promiču zdravlje, no postoji mali broj *in vivo* studija, s obzirom na opsežno provedene *in vitro* studije (Bebek Markovinović i sur., 2020). Istraživanje *in vivo* provedeno je na štakorima, oralnim unosom doze od 200 mg po kg tjelesne mase po danu vodenih ekstrakta lišća tokom 14 i 28 dana, čime se utvrdila *in vivo* sigurnost ekstrakata (Jurica i sur., 2018c; Jurica i sur., 2018d; Jurica i sur., 2018e). Ispitivanjem su, u bijelim krvnim

stanicama, utvrđena manja oštećenja na molekuli DNA, a hematološki parametri nisu se značajno promijenili (Jurica i sur., 2018c). Visoka biokompatibilnost uočena je između ekstrakata *A. unedo* te tkiva bubrega i jetre, što se zaključuje temeljem očuvanja integriteta molekule DNA u stanicama organa štakora te funkcije organa (Jurica i sur., 2018e; Orak i sur., 2011).

2.5. NAPREDNE TEHNOLOGIJE EKSTRAKCIJE U IZOLACIJI BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA

U skorije vrijeme, sve se više istražuje primjena novih tehnika izolacije za prehrambenu, farmaceutsku i kemijsku industriju kako bi se smanjila količina proizvedenog ugljikovog dioksida na globalnoj razini te smanjili energetske troškovi (Bousbia i sur., 2009). Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva u industriji najčešće se upotrebljavaju organska otapala. Neke od negativnih strana njihove primjene su: onečišćenje zraka, zaostajanje otapala u rafinatu i ekstraktima što posljedično umanjuje čistoću ekstrakta (Reverchon, 2003; Temelli, 2009). U zamjenu za organska otapala, prilikom ekstrakcije eteričnih ulja naprednim tehnologijama, može se koristiti i voda kao ekstrakcijsko otapalo, no zbog problema s nestašicom vode, javlja se interes za razvoj procesa koji mogu smanjiti potrošnju vode (Berka Zougali i sur., 2010). Zbog rastuće potražnje za visokom čistoćom proizvoda, energetske djelotvornim procesima koji ne zagađuju okoliš te koriste manje otapala, proučavaju se alternativni procesi za spomenute metode ekstrakcije otapalom (Reverchon, 2003; Bousbia i sur., 2009). Poznato je da nusprodukti prerađivačkih industrija, poput otpadnih biljnih ostataka, posjeduju brojne bioaktivne spojeve te predstavljaju izvor prirodnih antioksidansa. Među znanstvenicima se posebno javlja interes za razvojem tzv. „zelenih“ tehnika koje će omogućiti efikasno izdvajanje polifenola iz biljnih matrica, prema smjernicama koje su određene od strane međunarodne regulatorne agencije (Ameer i sur., 2017). Trenutno je ekstrakcija superkričnim fluidom (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE) najčešće korištena alternativa ekstrakciji otapalom, a mnogi komercijalno proizvedeni SFE spojevi su već dostupni (Reverchon, 2003; Brunner, 2005; Bousbia i sur., 2009). Uz navedenu, unaprjeđuju se i sljedeće tehnike: ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (Jun, 2009), mikrovalna ekstrakcija bez otapala (Bayramoglu i sur., 2008), ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (Loginova i sur., 2011), tehnologija trenutno kontroliranog pada tlaka (Berka-Zougali i sur., 2010), ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, subkrična ekstrakcija vodom, mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (Bousbia i sur., 2009), vodena dvofazna ekstrakcija (Chethana i sur., 2007) i vodena ekstrakcija potpomognuta enzimima (Niranjan i Hanmoungjai, 2004). Cilj spomenutih tehnika ekstrakcije jest omogućiti energetske prihvatljiv, učinkovit, održiv i komercijalno isplativ proces (Lloyd i van Wyk, 2012). Međutim, priroda biljnih matrica, potencijalnog analita i adekvatna

analitička svrha mogu imati učinak na kinetiku ekstrakcije, efikasnost i izbor novijih metoda ekstrakcije. Zbog toga se, u daljnjim istraživanjima, javlja potreba za proučavanjem suvremenih metoda u pilot mjerilima. S obzirom da kinetikom ekstrakcije upravljaju različiti mehanizmi, kao i procesni parametri, potrebne su mehaničke studije za metode zelene ekstrakcije. Kako bi se nove metode ekstrakcije mogle primijeniti na industrijsku razinu, ključno je eliminirati tehničke prepreke u procesima i dizajnu ovih tehnika (Ameer i sur., 2017).

Hikmawanti i sur. (2021) ispitivali su antioksidacijsku aktivnost lišća katuka (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) nakon korištenja različitih koncentracija etanola kao ekstrakcijskog otapala. Istraživanjem je utvrđeno da otapalo u različitim koncentracijama može utjecati na flavonoidne i fenolne spojeve te na aktivnost DPPH koji uklanja slobodne radikale iz ekstrakta listova katuka. Fenoli i flavonoidi ekstrahirani su u velikim količinama iz praha lista katuka metodom hladne maceracije primjenom 50 %-tnog etanola kao otapala, u usporedbi s primjenom 70 % i 96 % etanola. Štoviše, tijekom primjene 50 %-tnog etanola dobivena je najbolja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakta listova katuka. Time se pokazalo da je etanol učinkovito otapalo za ekstrakciju listova katuka, no potrebno je razmotriti stabilnost, koja je povezana sa sigurnošću ekstrakta, te visoku energiju i količinu vremena korištenu tijekom procesa isparavanja (Hikmawanti i sur., 2021).

Alexandre i sur. (2020) proučavali su uvjete ekstrakcije superkričnim fluidom, primjenom ugljikovog dioksida kao otapala te etanola kao suotapala, za dobivanje bioaktivnih spojeva s antiproliferativnim djelovanjem iz ostataka destilata *Arbutus unedo* L. Istraživanje je pokazalo važnost korištenja suotapala (etanola) u višim koncentracijama, uz maseni udio od 20 %, zbog povećanog prinosa ekstrakcije te antiproliferacijskog djelovanja, tj. većeg inhibicijskog učinka na rast stanica raka debelog crijeva. Dodatkom etanola došlo je do oporavka spojeva poput katehola, pirogalola i galne kiseline što je rezultiralo dobivanjem ekstrakata najnižih vrijednosti polovine maksimalne efektivne koncentracije (engl. *Half maximal effective concentration*, EC₅₀). U pogledu antiproliferacijskog djelovanja, čini se da fenolni spojevi najviše doprinose učinku, iako korelacija ne znači nužno izravnu uzročnost, između navedenih spojeva i niže vrijednosti EC₅₀ postoji jaka veza. Također, obnavljanje spojeva iz matrice, koja je ostatak, nudi mogućnost uspostave biorafinerije na ovom specifičnom mjestu proizvodnje, čime se postiže kružna bioekonomija i održivost (Alexandre i sur., 2020).

2.6. TEHNOLOGIJA ULTRAZVUKA U EKSTRAKCIJI – PRINCIP I MEHANIZAM DJELOVANJA

Ukoliko se unutar elastičnog medija pojavi razlika naprežanja, brzine čestica i pomicanja čestica, dolazi do nastanka zvučnih valova. Zvučni valovi prelaze u ultrazvučne prilikom dosega frekvencija valova do ultrazvučnog raspona. Bitna razlika koja dijeli elektromagnetske

valove od ultrazvučnih jest mogućnost širenja ultrazvučnog vala kroz tekuće, plinovite i krute medije, zahvaljujući svojoj mehaničkoj prirodi (Carreira-Casais i sur., 2021). Razlikuju se dvije skupine tehnologija ultrazvučnih valova, s obzirom na primjenu: ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta (Fu i sur., 2020). Karakteristike su, ultrazvuka niskog intenziteta, visoke vrijednosti frekvencije u rasponu od 5 do 10 MHz, uz niske vrijednosti razine snage manje od 1 W cm^{-2} . Poznat je i pod nazivom dijagnostički ultrazvuk, jer je zbog svoje nedestruktivnosti prikladan za ispitivanja i karakterizaciju raznih tvari (Carreira-Casais i sur., 2021). Ultrazvuk visokog intenziteta (tzv. ultrazvuk snage) posjeduje destruktivna obilježja, s obzirom na razinu snage od 10 do 1000 W cm^{-2} koju doseže te niske vrijednosti frekvencije od 20 do 100 KHz. Ova metoda može se koristiti za ubrzavanje kemijske reakcije te posjeduje razne učinke poput ekstrakcije, emulgiranja i drobljenja, zbog pojave kavitacijskih mjehurića koji implodiraju, pri čemu dolazi do oslobađanja energije (Arvanitoyannis i sur., 2017).

Metoda ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, za ekstrakciju bioaktivnih spojeva, rabi mehanički učinak, toplinski učinak i učinak kavitacije. Uporaba ultrazvuka dovodi do ruptore stanične stijenke, ubranog oslobađanja i difuzije staničnih komponenti tretiranog materijala (Chemat i sur., 2017). Predloženo je nekoliko mehanizama djelovanja ultrazvuka, to su fizički mehanizmi koji uključuju: eroziju, fragmentaciju, sonokapilarni učinak, lokalno smično naprezanje, sonoporaciju i detekturaciju (Chemat i sur., 2017; Khadhraoui i sur., 2018; Vinatoru i sur., 2017). Medij apsorbira energiju vibracije ultrazvuka, slijedi pretvorba iste u toplinu, a u skladu s time dolazi do povećanja topline medija. Spomenuti fenomen odnosi se na toplinski učinak ultrazvuka. Kalorijska vrijednost zavisi o sljedećim elementima: vrijeme izlaganja, svojstva medija i ultrazvučna snaga (Qiu i sur., 2020). Fenomen mehaničkog učinka ultrazvuka referira se na pojavu vibracije čestica unutar medija koji je izložen ultrazvuku sukladno mehaničkom valu. Navedeno dovodi do pojačanog gibanja čestica te, posljedično, ubranja procesa prijenosa mase (Wen i sur., 2018). Tijekom primjene ultrazvuka dolazi do ultrazvučne kavitacije, trećeg učinka koji se smatra prevladavajućim (Tiwari, 2015). Mehanizam djelovanja leži u stvaranju kavitacijskih jezgri, koje su podložne širenju, vibracijama i neprekidnoj akumulaciji energije iz akustičnog polja. Energija iznad odgovarajućeg praga rezultira rasprsnućem i naglim zatvaranjem mjehurića. Definirane su dvije vrste kavitacijskih mjehurića: stabilni i prolazni kavitacijski mjehurić. Razlikuju se prema životnom vijeku, prolazni kavitacijski mjehurić postoji vrlo kratko, dok je stabilan kavitacijski mjehurić prisutan u mediju duže vrijeme (Tzanakis i sur., 2014). Rasprsnućem mjehurića dolazi do pojave visokog tlaka (5000 K , 2000 atm) i visoke lokalizirane temperature, uz pratnju impresivne brzine hlađenja koja iznosi 109 K s^{-1} (Wen i sur., 2018). Povećanje tlaka i temperature, kao i formiranje slobodnih radikala, mogući su rezultat djelovanja intenzivnih hidrodinamičnih sila smicanja, prisutnih tijekom kavitacije (Tom´e Constantino i Garcia-Rojas, 2020). Zahvaljujući mehaničkom učinku, toplinskom učinku i učinku kavitacije, ultrazvuk djeluje

na prodiranje otapala u stanice, čime se pospješuje prijenos mase. Štoviše, djeluje i na rupturu stanične stijenke, što olakšava izdvajanje staničnog sadržaja (Yang i sur., 2017a; Rodrigues i Fernandes, 2017; Zhu i sur., 2017; Giacometti i sur., 2018). Razlog porasta proizvodnje, nakon korištenja ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, pripisuje se efikasnoj fragmentaciji stanica i učinkovitom prijenosu mase (Nn, 2015; Mnayer i sur., 2017). Preece i sur. (2017) smatraju da je razlog povećavanja u proizvodnji povećana topljivosti tvari nakon primjene metode, a ne prijenos mase i fragmentacija. Neka istraživanja pokazuju smanjenje bioaktivnih komponenti nakon tretiranja, zbog stvaranja slobodnih radikala prilikom ultrazvučne kavitacije (Zhang i sur., 2021). Zaključno, ovisno o parametrima i specifičnim uvjetima tijekom procesa, utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na bioaktivne spojeve može biti pozitivan i potencijalno negativan (Shen i sur., 2023; Bebek Markovinović i sur., 2023).

Prednost ove metode, u usporedbi s konvencionalnom, je skraćeno vrijeme ekstrakcije, uz visoku učinkovitost procesa, zahvaljujući fizikalnim svojstvima ultrazvučnih valova, koja uzrokuju pucanje staničnih stijenki (Mnayer i sur., 2017). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija odvija se na temperaturnom rasponu od 40 do 60 °C, što omogućava održivost aktivnih spojeva podložnih oksidaciji, hidrolizi i razgradnji pri visokim temperaturama. Štoviše, korištenje nižih temperatura prilikom procesa, rezultira smanjenom potrošnjom energije (Alupului i sur., 2009). Metoda je pogodna za uštedu potrebnog volumena otapala za ekstrakciju. Idealno sredstvo za ekspanziju ultrazvučnih valova predstavlja voda pa je ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija na bazi vode vrlo unaprjeđena te ne zahtjeva dodatna otapala za korištenje (Panadare i sur., 2020). Nadalje, primjenom metode omogućeno je olakšano pročišćavanje i odvajanje željenih sastavnica, kada je u pitanju manji broj nečistoća. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija prilagodljiva je tehnika, pogodna za ekstrakciju raznih komponenti iz širokog spektra biljaka, jer nije ovisna o molekularnoj težini i polaritetu spojeva (Chemat i sur., 2017). Osim primjenjivosti procesa u laboratoriju, u manjim razmjerima, upotreba je prikladna za industrijske i pilotske operacije. Negativne strane primjene navedene metode su nastajanje buke tijekom rada ultrazvučne opreme, jačine oko 65 dB, zbog čega je potrebna ugradnja zaštite od zvuka, što opremu čini skupljom. Parametri ultrazvukom potpomognute ekstrakcije moraju se optimizirati, za što je potrebno provesti mnogo eksperimenata, jer bioaktivne komponente, s obzirom na vrstu supstrata, imaju različite parametre (Shen i sur., 2023).

2.6.1. Tehnologija ultrazvuka u ekstrakciji bioaktivnih spojeva

Irakli i sur. (2018) proveli su istraživanje o optimizaciji ultrazvukom potpomognute ekstrakcije fenolnih spojeva te određivanju antioksidacijske aktivnosti na uzorku lišća masline. Primijećeno je da se s porastom temperature povećava difuzija fenolnih spojeva te poboljšava

topljivost spojeva, što je tipično i za druge metode ekstrakcije. Negativna strana viših temperatura jest gubitak antioksidacijske aktivnosti bioaktivnih spojeva, zbog osjetljivosti istih na toplinu. Tijekom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije uočeno je da niska ultrazvučna snaga ili amplituda te niže temperature uvjetuju niskom prinosu fenolne ekstrakcije. Povećanje prinosa fenolne ekstrakcije postiže se povećanjem navedenih parametara, ali do određenih graničnih vrijednosti. Daljnjim povećanjem parametara dolazi do razgradnje fenolnih spojeva i smanjuje se iskorištenje procesa ekstrakcije (Osorio-Tobo'n, 2020). Pomoću ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, iz lista ružmarina (*Salvia rosmarinus*), ekstrahirane su romanska i karnotinska kiselina (Bellumori i sur., 2016). Kada je u eksperimentu, kao otapalo, korišten etanol, u ekstraktu je dobiven visok udio sadržaja ružmarinske kiseline (6,8 % osušenog ekstrakta), a kada je kao otapalo korišten n-heksan, udjelom su dominirale karnozne kiseline (13 % osušenog ekstrakta). Također, ustanovljeno je da na rezultate ekstrakcije utječe koncentracija primijenjenog otapala. Nadalje, Xiang i sur. (2020) tretirali su list biljke *Eucommia ulmoides* s ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom u kombinaciji s ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima u svrhu izolacije flavonoidnih spojeva. Prinos ovog procesa bio je veći za 2,454 %, u usporedbi s prinosom svakog procesa zasebno. Lišće paprene metvice (*Mentha piperita*) je, nakon ultrazvučnog tretmana, podvrgnuto ekstrakciji metanolom, nakon čega je elektronskim mikroskopom skenirano lišće i trihom (lisna žlijezda). Temeljem mikroskopije uočeno je prisustvo dvaju mehanizama tijekom ekstrakcije: kroz kutikulu žljezdanih trihoma paprene metvice dolazi do difuzije produkta, a kroz oštećeni i slomljeni trihom produkt se izlučuje (Shotipruk i sur., 2001).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, uz povećani prinos bioaktivnih komponenti kao što su proteini, polifenoli i polisaharidi, može rezultirati povoljno ili nepovoljno na fizikalno-kemijska svojstva bioaktivnosti (Shen i sur., 2023). Prilikom razmatranja proteina, molekularna struktura određuje funkcionalnost samog proteina, a definirane su četiri strukturne razine: primarna, sekundarna, tercijarna i kvarterna. Tretiranjem ultrazvučnim valovima visokog intenziteta, proteini mogu podnijeti modifikacije koje uvjetuju nastanku funkcionalnih promjena. Razorno djelovanje na interakcije između molekula proteina, koje uzrokuje ultrazvučni tretman, rezultira odvijanjem proteina, što dovodi do povećanja izloženosti površina proteina (Yang i sur., 2017b). Sekundarna struktura proteina može se promijeniti u različitoj mjeri ovisno o uvjetima ultrazvučnog tretmana koji je primijenjen. Prilikom korištenja niskih frekvencija tijekom ultrazvučnog tretmana (20, 28 i 35 kHz) uočen je izraženiji efekt na sekundarnu strukturu, s obzirom na visoke frekvencije od 40 i 50 kHz. Stoga, opseg promjena u sekundarnoj strukturi proteina uvjetovan je odabirom frekvencije ultrazvuka (Ding i sur., 2021). Istraživanje provedeno na proteinu riže, koji je prethodno obrađen ultrazvukom, pokazalo je mogućnost širenja iz regije α -uzvojnica u oblikovanje β -nabrane ploče (Yang i sur., 2017c). Jin i sur. (2016) izvijestili su o promjenama u sekundarnoj strukturi, tj. smanjenju sadržaja α -uzvojnica i

povećanju β -nabranih ploča, nakon ultrazvučnog tretmana kukuruznog prolamina. Nakon primjene ultrazvuka na izolat sojinog proteina, primijećeno je da trajanje tretmana dulje od 10 minuta utječe na povećanje sadržaja α -uzvojnica, a sadržaj nasumičnih spiralnih struktura značajno je smanjen (Huang i sur., 2019). Inherentna svojstva proteina kao i metode korištene za ultrazvučno tretiranje uzrok su razlika u dobivenim rezultatima. Prilikom korištenja ultrazvukom potpomognute ekstrakcije za ekstrakciju proteina, potrebno je uračunati apsolutni zvučni tlak te jednoliku distribuciju zvučnog polja, ultrazvučnu snagu i vrijeme. Navedena razmatranja presudna su zbog mogućeg utjecaja na modifikacije u strukturi proteina, u krajnjem slučaju povećavajući efikasnost ekstrakcije (Shen i sur., 2023). U pogledu utjecaja ultrazvučnog tretmana na polifenolne spojeve, podvrgavanjem galne kiseline tretmanu, dolazi do gradacije spoja (Zhang i sur., 2015). Pod određenim ultrazvučnim uvjetima dolazi do razgradnje katehina u čaju. Unutar odgovarajućeg raspona, povišenjem ulazne snage i frekvencije ultrazvuka stupanj razgradnje katehina raste (Zhu i sur., 2018). Navedeno se povezuje sa stvaranjem slobodnih hidroksilnih radikala pri korištenju većih ultrazvučnih snaga koji reagiraju s fenolnim spojevima i razgrađuju ih. Važno je pripaziti na moguću razgradnju polifenolnih spojeva uzrokovanu korištenjem viših snaga ultrazvuka (Shen i sur., 2023). Kod ekstrakcije polifenolnih spojeva pomoću ultrazvuka, uporabom nižih frekvencija, pogotovo ispod 40 kHz, postiže se idealna učinkovitost (Dzah i sur., 2020). Potencijal nastajanja značajne količine slobodnih radikala, uzrokovan ultrazvukom visoke frekvencije usporedno s utjecajem velike snage ultrazvuka, izaziva degradaciju polifenola i kasnije smanjenje biološke aktivnosti istih. Temperatura ekstrakcije pažljivo se odabire, kako bi se očuvala stabilnost polifenolnih spojeva, zbog velike osjetljivosti na oksidaciju i hidrolizu pri povišenim temperaturama. Prikladni ultrazvučni uvjeti doprinose sadržaju fenolnih spojeva i njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti (Mehmood i sur., 2019; Kwaw i sur., 2018). Određeni ultrazvučni uvjeti mogu pridonijeti smanjenju molekulske mase polifenolnih spojeva. Dolazi do loma molekula i degradacije, zbog intenzivnih mehaničkih i posmičnih sila koje ultrazvuk može generirati. Na taj način može se smanjiti prosječna molekularna masa polifenola, a time se poboljšava probava, bioraspoloživost, apsorpcija i iskoristivost spojeva u organizmu (Shen i sur., 2023). Promatrajući utjecaj na polisaharide, intenzivan ultrazvuk dovodi do reakcija glikozilacije, oksidacije i aktualizacije unutar molekule (Rodrigues i Fernandes, 2017). Također, molekularna masa polisaharida može se smanjiti primjenom ultrazvuka (Shen i sur., 2023). Prosječna molekulska masa polisaharida *Ganoderma lucidum* veća je nakon ekstrakcije vrućom vodom (703,45 KDa), u usporedbi s masom nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (465,65 KDa) (Kang i sur., 2018). Štoviše, prosječna molekulska masa škroba, nakon ultrazvučnog tretmana, smanjena je s 3000 KDa na 500 KDa (Iida i sur., 2008). Tijekom ispitivanja učinka ultrazvuka na bioaktivnost i karakterizaciju polisaharida iz plodova crnog ribiza, uočeno je pojačanje antioksidacijske aktivnosti uz uklanjanje

superoksidnih i hidroksilnih radikala, inhibirana je peroksidacija lipida te se javljaju reakcije koje štite DNA od oštećenja (Xu i sur., 2018). Primjenom ultrazvučnog tretmana, aktivnost inhibicije α -glukozidaze i α -amina za polisaharide se povećava, posebice tijekom tretmana veće snage (600 W) koji ispoljava bolju učinkovitost od tretmana niže snage (400 W) (Shen i sur., 2023). Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti polisaharida *Ganoderma lucidum*, nakon ultrazvučne ekstrakcije pokazalo je niže vrijednosti, u usporedbi s tradicionalnom ekstrakcijom vrućom vodom. S obzirom na dobivene rezultate predložena su dva objašnjenja: omjer različitih monosaharida u sastavu i specifične veze bočnih ogranaka molekule odražavaju se na antioksidacijska svojstva polisaharida. Drugo objašnjenje odnosi se na spomenutu razliku prosječnih molekulskih masa dobivenu nakon obje ekstrakcije (Kang i sur., 2018). Primijećeno je da se upotrebom prekomjerne snage, učestalosti i trajanja može izazvati degradacija bioaktivnih sastavnica, stoga je potrebno odabrati parametre za specifične okolnosti kako bi se omogućila maksimalna bioraspoloživost tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Shen i sur., 2023).

2.6.2. Neki čimbenici od značaja pri ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji

U svrhu postizanja optimalne učinkovitosti ekstrakcije, poželjno je uskladiti parametre poput snage, frekvencije, pulsa, vremena i drugo (Shen i sur., 2023). Za ultrazvučnu snagu karakterističan je njezin izravan razmjer s amplitudom ultrazvuka. Upotrebom veće snage ultrazvuka dolazi do povećanja efikasnosti i prinosa ekstrakcije, zbog generiranja jače sile smicanja (Carreira-Casais i sur., 2021). Tijekom ekstrakcije kurkumina iz kurkume, primjenom različitih vrijednosti ultrazvučne snage, uočeno je povećanje prinosa ekstrakcije nakon povećanja snage sa 100 W na 200 W (Wang i sur., 2021). Štoviše, povećanjem snage s 30,34 W na 59,36 W, dobiven je porast u prinosu ekstrakta mandarinine kore (Nipornram i sur., 2018). U istraživanju koje su proveli Ćurko i sur. (2017) zamijećeno je znatno smanjenje ukupnih polifenola i antocijanidina u vinu, tijekom primjene velike snage. Navedeno se može pripisati razgradnji fenolnih spojeva, zbog reakcije s hidroksilnim radikalima koji nastaju pod visokom ultrazvučnom snagom (Dzah i sur., 2020). Do smanjenja je došlo i prilikom ekstrakcije polisaharida iz *Polygonum multiflorum*, kada je premašena vrijednost ultrazvučne snage od 140 W (Zhu i sur., 2016). Također, relevantna denaturacija proteina može biti izazvana dugotrajnom primjenom ili visokim intenzitetom ultrazvuka tijekom ekstrakcije (Tomè Constantino i Garcia-Rojas, 2020). Zaključno, s obzirom na specifične karakteristike uzoraka, važno je odabrati optimalnu razinu snage za provedbu procesa (Shen i sur., 2023).

Sposobnost efikasne ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz prirodnih proizvoda ispoljavali su ultrazvučni valovi s frekvencijama većima od 20 kHz (Yusoff i sur., 2022). Raspon frekvencija od 20 kHz do 100 kHz najčešće je u primjeni te ima utjecaj na efekt kavitacije koja

se javlja tijekom ekstrakcije. Utvrđeni su fizički i kemijski učinci kavitacije, kao posljedica pucanja mjehurića tijekom procesa, a navedene frekvencije upravljaju isključivo fizičkim učincima (Shen i sur., 2023). Kemijski učinci kavitacije pretežno su izazvani frekvencijama raspona od 200 do 500 kHz (Tiwari, 2015). Zhang i sur. (2021) analizirali su distribuciju, intenzitet zvučnog polja i promatrali su ciklus oscilacije kavitacijskih mjehurića uz pomoć oscilatora i analizatora spektra. Dobiveni rezultati ukazivali su da se različiti ciklusi oscilacija javljaju pri različitim vrijednostima frekvencije. Tijekom smanjenja ultrazvučne frekvencije dolazi do povećanja oscilacijskog ciklusa kavitacijskih mjehurića, što dovodi do većih vrijednosti radijusa mjehurića. Kao posljedica, dolazi do formiranja jačih mehaničkih valova i izraženog učinka kavitacije (Zhang i sur., 2021). Štoviše, javlja se korelacija između intenziteta zvuka i frekvencije. Za postizanje željenog učinka kavitacije ključno je pojačati ultrazvučni intenzitet s rastućom frekvencijom, na taj način prevlada se kohezivnost smjese (Niazi i sur., 2014). Frekvencijski raspon ultrazvuka odabire se s obzirom na vrstu materijala koji se podvrgava ekstrakciji. Sugestija je, temeljem brojnih istraživanja, korištenje niskih frekvencija (20-40 kHz) prilikom ekstrakcije savitljivih materijala poput biljnih tvari i algi (Shen i sur., 2023). Korištenje viših frekvencija (≤ 500 kHz) potrebno je kod čvrstih struktura (Dzah i sur., 2020; Panda i Manickam, 2019). Zvučni valovi, čiji je frekvencijski raspon djelovanja od 400 kHz do 2 MHz, nazivaju se megazvučni valovi. Valovi u ovom rasponu nude inventivan pristup za ubrzavanje nastajanja mliječne masti i poboljšanje čistoće ulja (Amarillo i sur, 2019). Potrebno je provesti brojne eksperimente i testove optimizacije, kako bi se utvrdila idealna frekvencija za specifičnu ekstrakciju, koja odgovara jedinstvenim svojstvima svakog ekstrakta (Shen i sur., 2023).

Ultrazvučni valovi povremeno mogu biti emitirani kao impuls, što je poznato pod nazivom pulsirajući ultrazvuk. Obilježje pulsa 5 s - 2 s podrazumijeva uključivanje ultrazvuka 5 sekundi i isključivanje 2 sekunde koje se ponavlja na ciklički način (Shen i sur., 2023). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, u pulsirajućem i kontinuiranom načinu rada, korištena je za ekstrakciju antioksidansa iz kore nara. Istraživanje je pokazalo da je pulsna ultrazvučna potpomognuta ekstrakcija vrhunski izvedba za proizvodnju antioksidansa iz kore nara uz visoku učinkovitost (Pan i sur., 2011). Rad ultrazvučne sonde predlaže se u pulsnom načinu rada, kada je u pitanju industrijska uporaba. Navedeno smanjuje toplinski učinak sonde na ekstrakt te je radni vijek sonde produljen (Shen i sur., 2023). Proučavana je antioksidacijska aktivnost i učinak ekstrakcije prilikom konvencionalne ekstrakcije, pulsirajuće ultrazvučne ekstrakcije te kontinuirane ultrazvučne ekstrakcije antioksidansa iz kore nara. U usporedbi s konvencionalnom metodom ekstrakcije, pulsirajuća ultrazvučna ekstrakcija pokazala je veću količinu ekstrahiranih antioksidansa za 22 % i kraće vrijeme ekstrakcije za 87 %. Korištenje kontinuirane ultrazvučne ekstrakcije na istoj razini intenziteta pokazalo je povećanje antioksidansa za 24 % i redukciju vremena ekstrakcije za 90 %. S obzirom na kontinuiranu

ultrazvučnu ekstrakciju, primjenom pulsirajuće ultrazvučne ekstrakcije dobivena je ušteda energije više od 50 % (Pan i sur., 2012).

Što se tiče vremena ekstrakcije, njegovim produljenjem može se povećati prinos ekstrakcije, no produljenom izloženošću dolazi do rizika od degradacije biljnih komponenti (Ranjha i sur., 2021). Korištenjem pulsno načina rada omogućeno je duže vrijeme ultrazvučne obrade. Princip pulsno načina rada leži u povremenoj aktivaciji i deaktivaciji snage ultrazvučne sonde pomoću generatora, a to povremeno prebacivanje snage onemogućava povećanje temperature reakcije tijekom duljeg trajanja obrade. Uočeno je da korištenje pulsirajućeg ultrazvuka, uz povećanu efikasnost ekstrakcije, doprinosi uštedi energije od 20 % do 51 % (Kobus i sur., 2021). Iz kore *Syzygium cumini* ekstrahirao se katehin uz ultrazvuk, u svrhu pojačavanja ekstrakcije. Tijekom eksperimenta proučavao se utjecaj raznih ultrazvučnih vremena na rezultat ekstrakcije, a primijenjene temperature iznosile su: 30 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C. Kada se vrijeme ekstrakcije produljilo za 15 – 20 minuta, prinos ekstrakcije se povećavao, a dulje vrijeme ekstrakcije rezultiralo je smanjenjem udjela. Stoga, temeljem korištene metode ultrazvuka i specifične komponente koja se ekstrahira, određuje se vrijeme obrade, koje je relativno kratko, između 5 – 15 minuta (Bhadange i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORAK LISTA PLANIKE

Prilikom ovog istraživanja korišteni su listovi planike (slika 1) koji su ubrani u Malom Lošnju, gradu na južnom dijelu otoka Lošinja u Primorsko–goranskoj županiji. Listovi su prije provedbe pokusa osušeni pri sobnoj temperaturi te samljeveni (slika 2) pomoću uređaja za usitnjavanje (Retsch GM 300, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) (slika 3). Samljeveni uzorak spremljen je u hermetički zatvorenu tamnu staklenu bočicu te skladišten na sobnoj temperaturi do provedbe analize.



Slika 1. List planike (vlastita fotografija)



Slika 2. Smljeveni list planike (vlastita fotografija)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Mehanizam djelovanja ultrazvuka na stanične strukture podrazumijeva stvaranje kavitacijskih mjehurića u otapalu korištenom za ekstrakciju prilikom ultrazvučnog tretmana. Implozija kavitacijskog mjehurića uzrokuje nastajanje mikrolokacija visoke temperature i tlaka što dovodi do rupture staničnog materijala. Ova metoda pospješuje ekstrakciju zbog boljeg kontakta materijala i otapala pri čemu dolazi do većeg prijenosa mase ekstrahirane tvari u otapalo (Putnik i sur., 2017).

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučni procesor (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka)
- Sonotroda S24d7 (materijal: titanij, promjer 7 mm, površina 42 mm², duljina 100 mm, za uzorke od 20 mL do 500 mL)
- Sonotroda S24d14D (materijal: titanij, promjer 14 mm, površina 173 mm², duljina 100 mm, za uzorke od 50 mL do 1000 mL)
- Sonotroda S24d22D (materijal: titanij, promjer 22 mm, površina 430 mm², duljina 100 mm, za uzorke od 100 mL do 2000 mL)
- Laboratorijska čaša, volumena 100 mL
- Špatula
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Odmjerna tikvica, volumena 100 mL
- Filter papir
- Pipeta
- Plastične kivete, volumena 50 mL

Postupak ekstrakcije

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija provedena pomoću ultrazvučnog procesora Hielscher UP400St uz destiliranu vodu kao ekstrakcijsko otapalo, a prema planu pokusa prikazanom u Tablici 1. Ispitivani izvori varijacija su: i) promjer sonde (7 mm, 14 mm i 22 mm), amplituda (50 % i 100 %), puls (50 % i 100 %) te vrijeme ekstrakcije (5 i 10 minuta).

U laboratorijskoj čaši se odvaže uzorak samljevenog lista planike približne mase 1 g. Potom se u čašu dodaje 80 mL destilirane vode uz povremeno miješanje uzorka staklenim štapićem. Uzorak je potom podvrgnut ekstrakciji (slika 4) prema planu pokusa (tablica 1). Prilikom provedbe ekstrakcije, uzorci su bili hlađeni ledom u kupelji. Dobiveni ekstrakt se

profiltrira preko filter papira u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se dopuni destiliranom vodom do oznake. Uzorci se iz odmjerne tikvice prebacuju u plastične kivete i pohranjuju se u hladnjaku na +4 °C do daljnje analize.



Slika 3. Postupak ekstrakcije lista planike uz pomoć ultrazvučnog procesora (vlastita fotografija)

Tablica 2. Plan pokusa za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju lista planike

R.br.	Promjer sonde	Amplituda (%)	Puls (%)	Vrijeme (min)
1	7 mm	50	50	5
2		100		5
3		50		10
4		100		10
5		50	100	5
6		100		5
7		50		10
8		100		10

Tablica 2. Plan pokusa za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju lista planike-
nastavak

R. br.	Promjer sonde	Amplituda (%)	Puls (%)	Vrijeme (min)	
9	14 mm	50	50	5	
10		100		5	
11		50		10	
12		100		10	
13		14 mm	50	100	5
14			100		5
15			50		10
16			100		10
17	22 mm		50	50	5
18			100		5
19			50		10
20			100		10
21		22 mm	50	100	5
22			100		5
23			50		10
24			100		10

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola temelji se na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Nastalo obojenje mjeri se spektrofotometrom pri valnoj duljini od 725 nm (Yuan i sur., 2018).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete

- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Plastična lađica za vaganje
- Špatula
- Pipeta, volumena 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200 μ L i 1000 μ L
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklena menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Stakleni lijevak

Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens, razrijeđen 5 puta (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Bezvodni natrijev karbonat (Lach-ner,s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: U laboratorijsku čašu odvaže se 75 g bezvodnog natrijevog karbonata koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 1000 mL, pomoću destilirane vode. Tikvica se destiliranom vodom dopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5 - 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis,USA)
- Otopina standarda galne kiseline 5 g L⁻¹

Priprema: U plastičnoj lađici odvaže se 500 mg galne kiseline koja se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola, a nakon otapanja galne kiseline u datom volumenu, odmjerna tikvica se do oznake dopuni destiliranom vodom.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Pripremljeni ekstrakti razrjeđuju se deset puta, stoga se u staklenu epruvetu redom dodaje 40 μ L ekstrakta, 360 μ L destilirane vode, 400 μ L Folin-Ciocalteu reagensa, prethodno razrijeđenog pet puta destiliranom vodom te 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijeva karbonata nakon čega se smjesa promiješa na Vortex uređaju. Reakcijsku smjesu potrebno je ostaviti 20 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 725 nm.

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu standardne otopine odvaži se 500 mg galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici volumena 100 mL, a preostali volumen dopuni se destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine, koncentracije 5 g L⁻¹, pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama, volumena 25 mL. Redom se otpipetira 50, 125, 250, 500, 750 i 1250 µL standardne otopine u svaku tikvicu te se preostali volumen dopuni destiliranom vodom do oznake, a dobivene koncentracije u tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150 i 250 mg L⁻¹.

Reakcijska smjesa uključuje dodavanje redom 400 µL otopine standarda iz svake tikvice, 400 µL pet puta prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata (w/v) u epruvete. U slijepu probu se, umjesto otopine standarda, dodaje destilirana voda. Nakon 20 minuta stajanja na sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 725 nm, a iz dobivenih se vrijednosti iscrtava baždarni pravac, pomoću programa Microsoft Excel. Na x-osi nalaze se vrijednosti koncentracije galne kiseline u mg L⁻¹, a na y-osi nalaze se vrijednosti izmjerene apsorbancije. Koncentracija fenola određuje se prema jednadžbi pravca [1]:

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad R^2 = 0,9983 \quad [1]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm,

x- koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹).

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom pri čemu je uzorak u metanolnom/etanolnom ekstraktu, a nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 415 nm (Chang, Yang, Wen, & Chern, 2002).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200, 1000 i 5000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25, 100 i 1000 mL

- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Špatula

Otapala i reagensi:

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol za HPLC $\leq 99,9$ % (Honeywell, Riedel-de-Haën™, Francuska)
- Aluminijev klorid, 98.5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijev klorid, 10 % (w/v)

Priprema: Odvaže se 10 g aluminijeva klorida, odvaga se otopi u 10 mL destilirane vode i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, a preostali volumen nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- Kalijev acetat, 99 %, bezvodni (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: Kalijev acetat, mase 9,845 g, otopi se u 10 mL destilirane vode. Otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, te se dopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina, 200 mg L⁻¹

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 20 mg standarda kvercetina. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 200 mL, pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola. Tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom nakon otapanja kvercetina u datom volumenu, a iz alikvotne otopine pripremaju se razrjeđenja: 10,25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹.

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (v/v)

Priprema: U odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se 800 mL metanola, a preostali dio volumena dopuni se destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina 80 %-tnog metanola dodaje se u drug. u odmjernu tikvicu, volumena 1000 mL, nakon što se prethodno doda 10 mL mravlje kiseline 80 %-tnim metanolom odmjerna tikvica se dopuni do oznake.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Za postavljanje reakcijske smjese u staklene epruvete dodaje se redom 0,5 mL pripremljenog ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 % aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete promiješa se na Vortex uređaju. Za slijepu probu način pripreme je isti, samo se umjesto ekstrakta dodaje otapalo za ekstrakciju (destilirana voda), a umjesto 0,1 mL 10 %-tnog aluminijeva klorida isti volumen destilirane vode. Epruvete s reakcijskom smjesom stoje 30 minuta te slijedi mjerenje apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 415 nm.

Izrada baždarnog pravca: Za izradu baždarnog pravca koristi se standardna otopina kvercetina, koncentracije 200 mg L⁻¹, od koje se pripreme razrjeđenja na način da se redom otpipetira 1,25, 3,125, 6,25, 9,375, 12,5 i 18,75 mL alikvota standardne otopine kvercentina u odmjernu tikvicu, volumena 25 mL. Tikvica se do oznake dopuni 100 %-tnim metanolom. Raspon pripremljenih koncentracija u tikvicama iznosi 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹, a za analizu se koristi i alikvotna otopina standarda koncentracije 200 mg L⁻¹.

Reakcijska smjesa postavlja se na način da se iz svake tikvice redom otpipetira 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba priprema se tako da se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti iznos volumena destilirane vode, a umjesto ekstrakta dodaje se 100 %-tni metanol.

Nakon 30 minuta stajanja reakcijske smjese slijedi mjerenje apsorbancije pri 415 nm valne duljine, a iz dobivenih vrijednosti izrađuje se baždarni dijagram u programu Microsoft Excel. Na y-osi nalaze se očitane vrijednosti apsorbancije pri 415 nm, a na x-osi nalaze se vrijednosti koncentracije kvercentina u mg L⁻¹. Koncentracija flavonoida određuje se prema jednadžbi pravca [2]:

$$y=0,0064x-0,0362 \quad R^2= 0,9998 \quad [2]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 415 nm,

x- koncentracija kvercentina (mg L⁻¹).

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Definirana metoda temelji se na određivanju ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se pri 320 nm i 360 nm na spektrofotometru (Howard, Clark, & Brownmiller, 2003).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Kvarcne kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200, 1000 i 5000 μ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Špatula

Otapala i reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g L⁻¹ HCl u 96 % etanolu (v/v)
- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g L⁻¹ HCl u 96 % etanolu (v/v)

Priprema: U odmjernu tikvicu, volumena 100 ml, otpipetira se 0,227 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline. Preostali volumen tikvice dopuni se 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Klorovodična otopina 2g L⁻¹ HCl u vodi (v/v)

Priprema: U odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, otpipetira se 0,454 mL 37 %-tne koncentrirane klorovodične kiseline. Preostali volumen tikvice dopuni se 96 %-tnim etanolom do oznake.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina 600 mg L⁻¹

Priprema: 60 mg standarda kvercetina odvaži se u plastičnoj lađici. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola. Nakon otapanja kvercetina, odmjerna tikvica se do oznake dopuni 100 %-tnim metanolom. Dobivena je otopina standarda kvercetina koncentracije 600 mg L⁻¹.

- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Standard klorogenske kiseline koncentracije 600 mg L⁻¹

Priprema: U plastičnoj lađici odvažuje se 60 mg standarda klorogenske kiseline koja se u 30 mL volumena 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi. Tikvica se dopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Dobivena je otopina standarda klorogenske kiseline koncentracije 600 mg L⁻¹.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Prilikom postavljanja reakcije u staklenu epruvetu redom se otpipetira 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g L⁻¹ HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl te se sadržaj promješa na Vortex uređaju. Za pripremu slijepe probe, umjesto ekstrakta, koristi se otapalo korišteno prilikom ekstrakcije (destilirana voda). Mjerenjem apsorbancije uzorka pri 320 nm određuju se ukupne hidroksicimetne kiseline, a mjerenjem apsorbancije uzorka pri 360 nm određuju se ukupni flavonoli.

Izrada baždarnog pravca za određivanje hidroksicimetnih kiselina: Za određivanje koncentracije hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim uzorcima priređuje se baždarni dijagram pri čemu se kao standardna otopina koristi klorogenska kiselina. Priređuju se razrjeđenja od: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg L⁻¹ tako da se iz alikvotne otopine standarda od 600 mg L⁻¹ otpipetira u odmjerne tikvice od 25 ml redom: 0,416, 1,042, 2,083, 3,125, 4,166, 6,25, 8,333, 12,5 i 20,833 mL. Odmjerna tikvica se do oznake dopuni 100 %-tnim metanolom. U slijepu probu se umjesto standarda dodaje 100 %-tni metanol, a koraci u pripremi su jednaki.

Postavljanje reakcijske smjese u epruveti uključuje dodatak 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g L⁻¹ HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Prilikom određivanja hidroksicimetnih kiselina na valnoj duljini od 320 nm koriste se kvarcne kivete. Jednadžba pravca za određivanje hidroksicimetnih kiselina, dobivena mjerenjem, glasi [3]:

$$y=0,0025x-0,0038 \quad R^2= 0,9996 \quad [3]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 320 nm,

x- koncentracija klorogenske kiseline (mg L⁻¹).

Izrada baždarnog pravca za određivanje flavonola: Za određivanje koncentracije flavonola u ispitivanim uzorcima priređuje se baždarni dijagram pri čemu se kao standardna otopina koristi kvercetin. Standardna otopina kvercetina, koncentracije 600 mg L⁻¹, ishodišna je otopina za pripremu razrjeđenja: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500 mg L⁻¹. U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se otopina alikvota redom: 0,416, 1,042, 2,083, 3,125, 4,166, 6,25, 8,333,

12,5, 16,666 i 20,833 mL. Odmjerna tikvica se dopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Isti način pripreme je i za slijepu probu, no umjesto standarda stavlja se 100 %-tni metanol.

Postavljanje reakcijske smjese u epruveti uključuje dodatak 250 μL otopine standarda, 250 μL 1g L⁻¹ HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Prilikom određivanja flavonola na valnoj duljini od 360 nm koriste se staklene kivete. Jednadžba pravca za određivanje flavonola, dobivena mjerenjem, glasi [4]:

$$y=0,0026x+0,0083 \quad R^2= 0,9995 \quad [4]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 360 nm,

x- koncentracija kvercetina (mg L⁻¹).

3.2.5. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Specifičnost spojeva iz skupine flavan-3-ola je mogućnost reakcije s vanilinom pri čemu dolazi do nastajanja obojenih spojeva što je princip određivanja polimernih proantocijanidina. Spojevi se kvantitativno određuju mjerenjem intenziteta nastalog obojenja, pri valnoj duljini od 500 nm (Sun et al., 1998).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf volumena 100 μL i 1000 μL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastične ladice za vaganje
- Špatula
- Stakleni lijevak
- Filter papir
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL i 250 mL

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC $\leq 99.9\%$ (Honeywell, Riedel-de-Haën™, Francuska)
- Vanilin, 99% (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: Odvažuje se 1 g vanilina i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se ista dopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

- Koncentrirana H_2SO_4 , 96% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H_2SO_4

Priprema: U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se manja količina 100 %-tnog metanola (otprilike 20 mL), nakon toga dodaje se 13,02 mL H_2SO_4 . Prilikom dodavanja H_2SO_4 u manjim obrocima, tikvica se drži u hladnoj vodenoj kupelji. Tikvica se, nakon dodatka cijelog volumena sumporne kiseline, dopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g L^{-1})

Priprema: U plastičnoj ladici za vaganje odvažuje se 500 mg katehina. Odvaga se otopi u 10 mL 100 %-tnog metanola te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL, a potom se tikvica dopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Postupak postavljanja reakcijske smjese uključuje dodatak 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H_2SO_4 i 1 mL ekstrakta u staklene epruvete. Slijepa proba priprema se na isti način, no umjesto ekstrakta, dodaje se otapalo korišteno za ekstrakciju (destilirana voda). Sadržaji epruveta homogeniziraju se na Vortex uređaju. Pripremljene reakcijske smjese stoje 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 500 nm.

Izrada baždarnog pravca: Pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5 g L^{-1} iz koje se priređuju razrjeđenja 10, 30, 60, 90 i 120 mg L^{-1} na način da se otpipetira redom: 50, 150, 300, 450 i 600 μL otopine. Za pripremu otopina koriste se odmjerne tikvice, volumena 25 mL, koje se do oznake, nakon dodatka određenog volumena katehina, dopune 100 %-tnim metanolom.

Za postavljanje reakcijske smjese iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda, potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H_2SO_4 . Nakon stajanja 10 minuta, mjeri se apsorbanacija pripremljenih smjesa na valnoj duljini od 500 nm. Za pripremu slijepa probe umjesto ekstrakta koristi se metanol.

Izmjerene apsorbanacije koriste se za izradu baždarnog pravca u programu Microsoft Excel pri čemu se na x-osi nalaze vrijednosti koncentracije katehina (mg 100 mL^{-1}), a na y-osi vrijednosti

izmjerene apsorbancije pri 500 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca određuje se koncentracija polimernih proantocijanidina [5]:

$$y=0,0053x-0,0124 \quad R^2= 0,9985 \quad [5]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 500 nm,

x- koncentracija katehina (mg L⁻¹).

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) metodom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom podrazumijeva redukciju žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ). Ovom reakcijom nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin čiji je apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 593 nm (Benzie, 1996).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Električna vodena kupelj Grant (JBN5, Cambridge, UK)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Špatula

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC ≤ 99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën™, Francuska)
- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karbonska kiselina), 1 mM

Priprema: Odvaže se 0,025 g Troloxa za pripremu 1 mM otopine Troloxa. Masa se otopi u 100 %-tnom metanolu, prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se dopuni do oznake 100 %-tnim metanolom, a pripremljena otopina služi za pripremu baždarnog pravca.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 330 µL 37 %-tne klorovodične kiseline te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 0,156 g TPTZ-a te se masa kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, a tikvica se do oznake dopuni 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezov(III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Željezov(III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se masa željezo (III)-klorida heksahidrata od 0,2705 g koja se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 50 mL, a preostali volumen tikvice dopuni se destiliranom vodom do oznake.

- Ledena octena kiselina, $\geq 99,8\%$ (Honeywell, Fluka™, Seelze, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se masa natrij-acetat trihidrata od 3,1 g koja se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 1000 mL. U odmjernu tikvicu dodaje se 16 mL glacijalne octene kiseline, a preostali volumen tikvice nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši, volumena 1000 mL, pomiješa se 500 mL acetatnog pufera (0,3 M), 50 mL TPTZ reagensa i 50 mL željezo (III)-klorida za pripremu FRAP reagensa. FRAP reagens priprema se u omjeru 10:1:1.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Prije postavljanja reakcijske smjese potrebno je sve pripremljene reagense, uključujući i standarde, inkubirati na temperaturu od 37 °C. Pripremljeni ekstrakt razrjeđuje se 40 puta tako da se u staklenu epruvetu dodaje 15 µL ekstrakta i 585 µL destilirane

vode te 4500 µL FRAP reagensa. Sadržaj epruvete se dobro promiješa te termostatira na 37 °C 10 minuta. Koraci su isti kod pripreme slijepa probe, samo se umjesto uzorka dodaje otapalo korišteno prilikom ekstrakcije. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 593 nm.

Izrada baždarnog pravca: Kako bi se pripremio baždarni dijagram pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Odvaži se 0,0025 g Troloxa, a izvagana masa se otopi u 100 %-tnom metanolu te se istim dopuni do oznake u tikvici od 100 mL.

Od ishodne otopine pripremaju se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150 µM na način da se u odmjerne tikvice, volumena 25 mL, redom doda 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 3,125; 3,75 i 5 mL. Tikvice se do oznake napune 100 %-tnim metanolom. 600 µL otopine standarda pomiješa se s 4500 µL FRAP reagensa u staklenoj epruveti. Reakcijska smjesa se promiješa i inkubira u vodenoj kupelji na 37 °C 10 minuta. Isto vrijedi i za slijepu probu, samo se umjesto uzorka dodaje 100 %-tni metanol.

Vrijednosti apsorbancije mjere se na valnoj duljini od 593 nm, a iz dobivenih podataka nacrtaju se baždarni pravci pomoću programa Microsoft Office Excel. Na x-osi pravca nalaze se vrijednosti koncentracije Troloxa (µM), a na y-osi nalaze se vrijednosti apsorbancije. Dobivena jednadžba pravca služi za izračun antioksidacijskog kapaciteta uzoraka određenog FRAP metodom [6]:

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad R^2 = 0,9992 \quad [6]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 593 nm,

x- koncentracija Troloxa (µM).

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) metodom

Sposobnost molekule antioksidanasa da reducira stabilni radikal kation 2,2'-azinobis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS⁺) temelj je određivanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom. Stabilni ATBS⁺ kation reducira se uz prisutnost antioksidansa pri čemu dolazi do obezbojenja plavo-zelene otopine (Re i sur., 1999).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete

- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Staklene epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 5 mL i 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100 μ L i 1000 μ L

Otapala i reagensi:

- 7 mM otopina ABTS⁺(m/v)

Priprema: U odmjernoj tikvici od 5 mL doda se odvagana masa 0,0192 g ABTS⁺ -a te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- 140 mM otopina kalijeva persulfata (m/v), K₂S₂O₈

Priprema: U odmjernoj tikvici od 5 mL doda se odvagana masa 0,18920 g K₂S₂O₈ koja se otopi, a odmjerna tikvica se do oznake dopuni destiliranom vodom.

- Otopina ABTS reduciranog kationa

Priprema: Prethodno je potrebno nadodati 88 μ L otopine kalijeva persulfata (140 mM) u 5 mL otopina ABTS⁺ (7 mM) te tako pripremljenu smjesu čuvati u mraku od 12 h do 16 h. Drugi dan se od te otopine pripremi 1,5 %-tna otopina ABTS⁺ na način da se otpipetira 1500 μ L ABTS⁺ reagensa u odmjernu tikvicu od 100 mL, a preostali volumen tikvice dopuni se do oznake 96 %-tnim etanolom. Pripremljenoj otopini se, uz etanol kao slijepu probu, mjeri apsorbancija koja treba iznositi 0,734 \pm 0,02. Ako iznos apsorbancije prelazi 0,734 potrebno je otopinu razrijediti 96 %-tnim etanolom, a ukoliko je iznos apsorbancije manji, u otopinu se nadodaje ATBS⁺ reagens u malim volumnim obrocima. Mjerenje se ponavlja do kad se ne postigne željena apsorbancija.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: Pripremljeni ekstrakti prethodno se razrijede 50 puta u destiliranoj vodi nakon čega se otpipetiraju u staklenu epruvetu u volumenu od 160 μ L. Nakon toga dodaje se 2 mL ABTS⁺ otopine i smjesa se, nakon miješanja na Vortex uređaju, inkubira 10 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, te slijedi spektrofotometrijsko mjerenje uz 96 %-tni etanol kao slijepu probu.

Izrada baždarnog dijagrama: Otopine ABTS⁺ u koncentracijama od 0, 25, 50, 100, 200 i 300 μ M koriste se za izradu baždarnog dijagrama pri čemu se mjeri apsorbancija svake otopine na valnoj duljini od 734 nm.

Na temelju izmjerenih vrijednosti nacrtava se baždarni dijagram pomoću programa Microsoft Excel. Na x-osi nalaze se vrijednosti koncentracije ABTS⁺ otopine, a na y-osi nalaze se

vrijednosti izmjerene apsorbancije pri 734 nm. Na temelju dobivene jednadžbe dobiva se antioksidacijski kapacitet ABTS metodom glasi [7]:

$$y = -0,0015x + 0,5143 \quad R^2 = 0,9992 \quad [7]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 734 nm,

x- koncentracija ABTS⁺ otopine (μM).

3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH) metodom

Metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti (AA) temelji se na uporabi stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal ljubičaste je boje, a zbog nesparenog elektrona, svoj apsorpcijski maksimum postiže na valnoj duljini 517 nm, vidljivog dijela spektra. Prilikom spajanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa stvara se reducirani oblik DPPH-H što dovodi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Broj sparenih elektrona i promjena boje u stehiometrijskom su odnosu (Braca et al., 2001; Prior et al., 2005).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000 μL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična ladica za vaganje
- Špatula

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC ≤ 99,9 % (Honeywell, Riedel-de-HaënTM, Francuska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) 0,2 mM u 100 % metanolu (v/v)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se masa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala od 0,0079 g. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu, nakon čega se prenese kvantitativno u odmjernu tikvicu, volumena 100 mL. Preostali volumen tikvice nadopuni se do oznake 100 %-tnim metanolom. Otopina DPPH čuva se u zatvorenoj tikvici na tamnom mjestu.

- Otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) 0,5 mM u 100 % metanolu (v/v)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. Odvaga se otopi u manjem volumenu 100 %-tnog metanola te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, volumena 100 ml. Preostali volumen tikvice do oznake nadopuni se 100 %-tnim metanolom te se tikvica s pripremljenom otopinom čuva zatvorena na tamnom.

- Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) 1 mM

Priprema: Odvažuje se 0,025 g Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) te se otopi u 100 %-tnom metanolu, prenese u tikvicu od 100 mL koja se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom. Pripremljena 1 mM otopina Trolox koristi se za pripremu baždarnog dijagrama.

Priprema uzorka: način pripreme uzorka opisan je u potpoglavlju 3.2.1.

Postupak određivanja: U epruvetu se otpipetira 1,5 mL pripremljenog ekstrakta prethodno razrijeđenog 5 puta. Od 24 ekstrakta, 17. ekstrakt u ovom mjerenju nije bio razrijeđen. Nakon dodatka ekstrakta, u epruvetu se dodaje 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Potrebno je pripremiti kontrolu u koju se dodaje 1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Izmjerena apsorbancija kontrole oduzima se od izmjerene apsorbancije uzorka. 4,5 mL 100 %-tnog metanola ulijeva se u epruvetu kao slijepa proba. Nakon priprema reakcijskih smjesa, sadržaj se promješa na Vortex uređaju te stavlja u mrak na 20 minuta pri sobnoj temperaturi, slijedi mjerenje apsorbancije pri 517 nm uz metanol kao slijepu probu. Ako izmjerene vrijednosti prelaze 1,0 potrebno je razrijediti ekstrakt kako bi se izmjerene vrijednosti nalazile u intervalima između 0,1 i 0,9.

Izrada baždarnog dijagrama: Otopina 1 mM Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koja služi za izradu baždarnog dijagrama priprema se na način da se odvažuje 0,025 g Trolox koji se otopi u 100 %-tnom metanolu. Otopljeni odvaga prenese se u tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Iz pripremljene otopine redom se otpipetira 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 3,125; 3,75 i 5 mL u odmjerne tikvice od 25 mL.

Tikvice se do oznake dopune 100 %-tnim metanolom, a dobivene koncentracije iznose 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μM . 1,5 mL odgovarajuće otopine Troloxa otpipetira se u epruvetu te se dodaje 3 mL 0,2 mM otopine DPPH.

1,5 mL 100 %-tnog metanola te 3 mL 0,5 mM otopine DPPH potrebno je otpipetirati za kontrolu, a za slijepu probu koristi se 4,5 mL 100 %-tnog metanola koji se otpipetira u epruvetu. Prije mjerenja apsorbancije, na valnoj duljini od 517 nm, epruvete stoje 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Slijepa proba pri mjerenju je 100 %-tni metanol. Na temelju izmjerenih rezultata dobivena je jedandžba pravca za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom [8]:

$$y = -0,0037x + 2,3781 \quad R^2 = 0,9994 \quad [8]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 517 nm,

x- koncentracija Troloxa (μM).

3.3. OBRADA REZULTATA

Prilikom eksperimentalnog određivanja, za svaki uzorak izmjerene su vrijednosti dvaju paralelnih određivanja, a dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel, prikazani kao srednja vrijednost paralela \pm standardna devijacija. Iz grafičkog prikaza vidljive su vrijednosti udjela fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, polimernih proantocijanidina kao i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog metodama: FRAP, ABTS, DPPH, u ovisnosti o parametrima ekstrakcije: promjer sonde, amplituda, puls i vrijeme.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U eksperimentalnom radu ispitana su 24 uzorka ekstrakta lista planike pri čemu je ekstrakcija provedena ultrazvukom uz variranje procesnih parametara: promjer sonde (7 mm, 14 mm, 22 mm), amplituda (50 %, 100 %), puls (50 %, 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5 minuta, 10 minuta). U svim uzorcima ekstrakata spektrofotometrijski su određivane koncentracije bioaktivnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, polimerni proantocijanidini), te antioksidacijski kapacitet uzoraka primjenom metoda FRAP, ABTS i DPPH. Eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

4.1. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

Na slici 4 prikazan je prinos ukupnih fenola u vodenim ekstraktima listova planike s obzirom na promjer korištene sonde ultrazvučnog procesora tijekom ekstrakcije. Iz rezultata je vidljivo da je najveći udio fenolnih spojeva dobiven u uzorku 24 koji je tretiran sondom promjera 22 mm, vrijednosti amplitude 100 %, vrijednosti pulsa 100 % te vremenu ekstrakcije od 10 minuta. Najmanji prinos uočen je kod uzorka 1, čiji su parametri: promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme ekstrakcije 5 minuta. Prema navedenim podacima vidljivo je da najinvaziviji uvjeti ultrazvučne ekstrakcije daju najveći prinos ukupnih fenola, dok se najmanji prinos ostvaruje tretmanom s najblažim uvjetima. Vrijednosti ukupnih fenola bile su podjednake u uzorcima broj: 1, 9 i 17 koji su tretirani jednakim parametrima amplitude (50 %), pulsa (50 %) i vremena tretmana (5 minuta) iako su primjenjene sonotrode različitog promjera (7 mm, 14 mm, 22 mm). Razlika u prinosu između korištenih sonda uočljiva je pri parametrima: amplituda 100 %, puls 100 % i vrijeme 10 minuta, gdje je najveći prinos dobiven u uzorku koji je tretiran sondom 22 mm. Šic Žlabur i sur. (2015) izolirali su fenolne spojeve iz lista *Stevie rebaudiane Bertoni* ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom. Prilikom istraživanja korištene su sonde promjera 7 mm i 22 mm. Dobiveni prinos ukupnih fenolnih spojeva bio je veći kad je tijekom tretmana korištena sonda od 22 mm ($77,89 \pm 2,28$ mg g⁻¹ uzorka), u usporedbi sa sondom promjera 7 mm ($59,43 \pm 2,11$ mg g⁻¹ uzorka). Navedeno je djelomično u skladu s dobivenim rezultatima o prinosu ukupnih fenolnih spojeva iz lista planike, obzirom da trend povećanja prinosa s povećanjem promjera sonde nije posve linearan, ali u konačnici najveći sadržaj ukupnih fenolnih spojeva zabilježen je primjenom sonde najvećeg promjera (uzorci 23 i 24).

Prilikom povećanja vrijednosti amplitude s 50 % na 100 % uočen je nagli porast prinosa fenolnih spojeva neovisno o promjerima sonde uz vrijednost pulsa 50 % i trajanje ekstrakcije

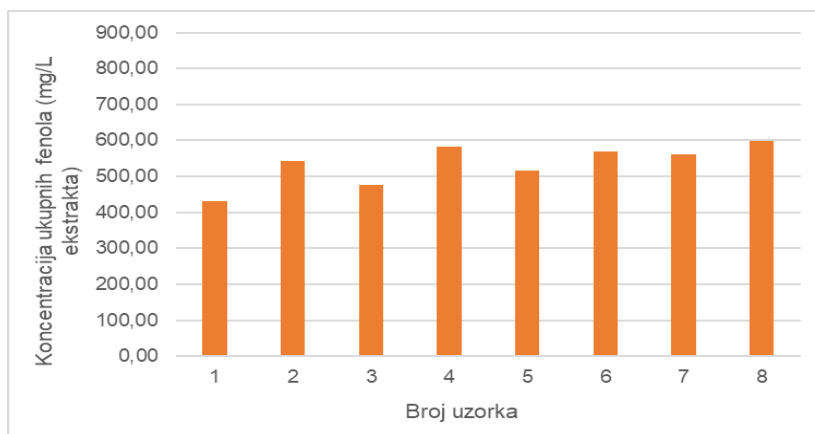
od 5 minuta. Trend povećanja udjela fenola vidljiv je u uzorcima nakon povećanja amplitude s 50 % na 100 %, izuzev uzorka 15 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 16 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta). Carrea i sur. (2012) ispitivali su utjecaj amplitude (20 %, 50 % i 100 %) na prinos fenolnih spojeva tijekom ultrazvučno potpomognute ekstrakcije iz grožđa. Najmanji prinos ostvaren je uz amplitudu 20 %, a najveći pri amplitudi 100 %, no nije vidljiva značajna razlika između rezultata dobivenih pri amplitudama 50 % i 100 % (Carrea i sur., 2012). Usporedbom rezultata dobivenih tijekom ekstrakcije fenolnih spojeva iz listova planike uz amplitude 50 % i 100 %, razlika u prinosu fenolnih spojeva ipak je zamjetna.

Povećanjem pulsa dolazi do naglog skoka povećanja udjela fenola. Promjenom vrijednosti pulsa s 50 % na 100 %, povećava se udio fenolnih spojeva u ekstraktima. Bebek Markovinović i sur. (2023) tretirali su ultrazvukom visoke snage sokove od jagoda uz promjenu vrijednosti pulsa (50 %, 100 %). Veće vrijednosti fenolnih spojeva uočene su nakon tretmana pulsom od 100 %, što je u skladu s dobivenim prinosima za list planike.

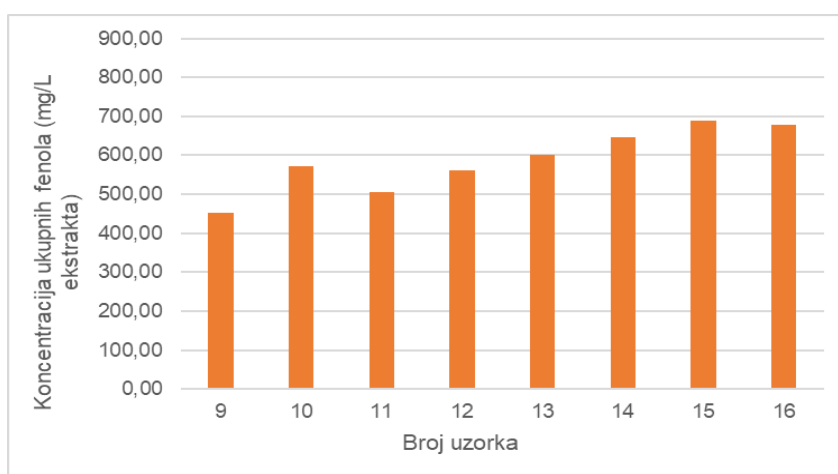
Uspoređujući uzorke prema vremenu trajanja ekstrakcije, zabilježen je porast udjela fenolnih spojeva u uzorcima koji su tretirani duže (10 minuta vs. 5 minuta), izuzev uzorka 10 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 12 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 10 minuta). Uzorak 10 neznatno premašuje u iznosu sadržaja ukupnih fenola od uzorka 12. Razlog ovog odstupanja mogao bi se pripisati analitičkoj pogrešci, mogućoj oksidaciji uzoraka prilikom skladištenja ili utjecaju zagrijavanja uslijed ekstrakcije što posljedično može rezultirati degradacijom termolabilnih fenolnih spojeva.

Derbassi i sur. (2022) ekstrahirali su fenolne spojeve iz lišća *Arbutus unedo* L. pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Tijekom istraživanja, ispitani su rasponi vremena ekstrakcije (5-30 minuta) i snage (50-500 W), a kao otapalo korišten je etanol u različitim koncentracijama (0-100 %). Rezultati optimizacije procesa ukazuju da vrijeme ekstrakcije od 13 minuta i snaga od 402 W, uz 36 %-tni etanol kao otapalo daju najveći prinos suhog ostatka zaostalog nakon ekstrakcije čija količina pozitivno korelira sa sadržajem ekstrahiranih bioaktivnih spojeva (katehina, izoramnetin-*O*-deoksiheksozida, kvercetin-*O*-deoksiheksozida, luteolin-*O*-deoksiheksozida i ukupne količine fenolnih spojeva). Navedeni zaključak u skladu je s dobivenim rezultatima jer je prinos fenolnih spojeva nakon 10 minuta, uz amplitudu 100 %, veći od prinosa dobivenog amplitudom 50 % i vremenom od 5 minuta, neovisno o promjerima sonde. Habachi i sur. (2022) također su odredili ukupnu koncentraciju fenola u listu planike pomoću ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, uz vodu kao otapalo. Iskorištenje procesa je 29 %, a dobivena vrijednost iznosila je $48 \pm 1,5$ mg GAE g⁻¹ DW, uz ekstrakcijske parametre: snaga 180 W, frekvencija 40 kHz i vrijeme trajanja 30 minuta. Usporedbom naših rezultata prinosa s rezultatima Habachi i sur. (2022) vidljivo je da su slične vrijednosti prinosa

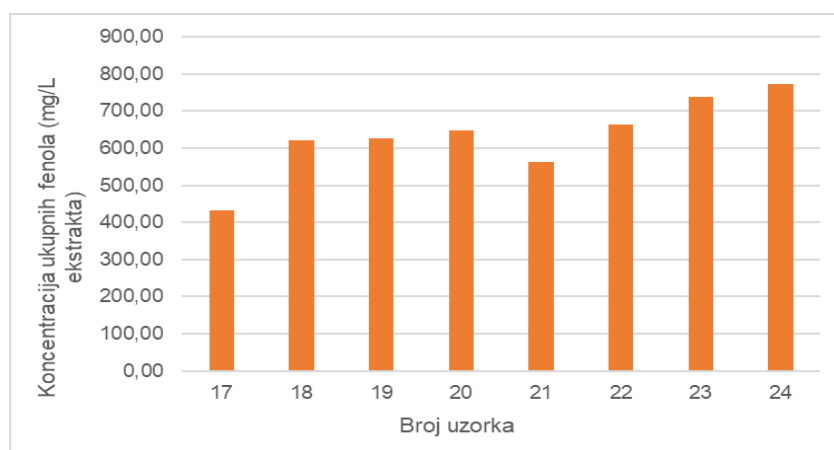
ukupnih fenola zabilježene pri daleko kraćem vremenu tretmana (5 minuta). Rezultati sugeriraju da je kraće vrijeme tretmana rezultiralo podjednakim prinosom ukupnih fenola, a mogući razlog tome mogao bi biti u jakosti ultrazvučnog procesora.



a)



b)



c)

Slika 4. Prinos ukupnih fenola u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjere korištene sonde ultrazvuka tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

4.2. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FLAVONOIDA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

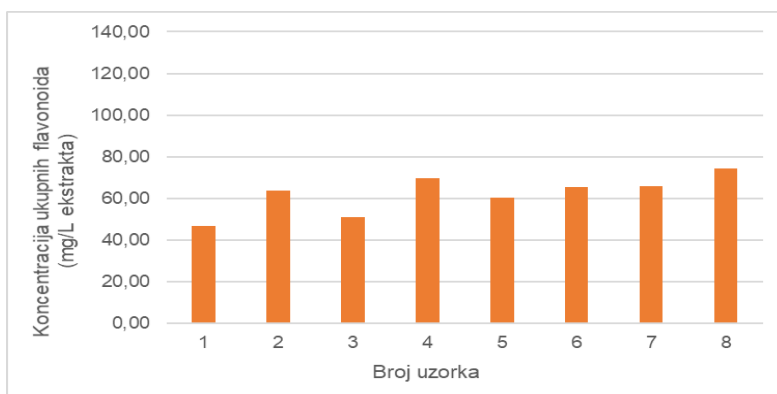
Na slici 5 prikazan je prinos ukupnih flavonoida u vodenim ekstraktima listova planike s obzirom na promjer ultrazvučne sonde. Najveći udio flavonoida određen je u uzorku 24 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta). Slično kao i za koncentracije ukupnih fenola, najniže koncentracije ukupnih flavonoida ostvarene su uz ekstrakcijske parametre: promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta (uzorak 1). Uzimajući u obzir promjere korištenih sonda, pri parametrima amplitude 50 %, pulsa 50 %, vremena 5 minuta, u uzorcima 1, 9, 17 su prinosi flavonoidnih spojeva podjednaki. Povećavanjem samo jednog ekstrakcijskog parametra, bilo amplitude, pulsa ili vremena, veći prinos ostvaruje se primjenom sonde većeg promjera. Najveći udio flavonoida zabilježen je u uzorcima ekstrahiranim sondom najvećeg promjera (22 mm), a najmanji u ekstraktima ekstrahiranim pri sondi najmanjeg promjera (7 mm). Šic Žlabur i sur. (2015) su odredili udio flavonoida u ekstraktima lista *Stevia rebaudiana Bertoni* dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom (sonde promjera 7 mm i 22 mm). Veći prinos flavonoida ostvaren je uz sonde većeg promjera ($62,48 \pm 3,63 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka) u odnosu na sondu manjeg promjera ($45,76 \pm 2,13 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka).

Promotri li se utjecaj amplitude, u svim uzorcima je došlo do povećanja prinosa flavonoida pri povećanju vrijednosti amplitude (50 % vs. 100 %). Gómez-Cruz i sur. (2021) su uz pomoć ultrazvuka ekstrahirali flavonoide iz komine masline, uz vrijednosti amplitude 30 %, 50 %, 70 %. Najveći prinos flavonoida postignut je pri amplitudi 70 %, što je u skladu s rezultatima ovog rada, ukazujući da je najveći prinos također ostvaren pri najvećoj vrijednosti amplitude. No, u nekim uzorcima komine masline zabilježeno je smanjenje prinosa flavonoida nakon povećanja vrijednosti amplitude tijekom tretmana.

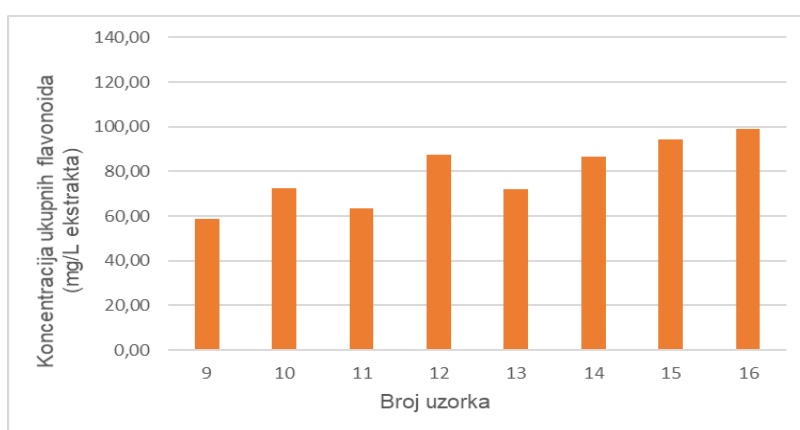
Povećanjem pulsa s 50 % na 100 %, koncentracije flavonoida su se neznatno povećale u uzorcima tretiranim sondom promjera 7 mm, dok je veće povećanje u prinosu flavonoida vidljivo kod uzoraka koji su tretirani sondama promjera 14 mm i 22 mm.

Neovisno o ostalim ekstrakcijskim parametrima, produlji li se vrijeme ekstrakcije (5 minuta vs. 10 minuta), dolazi do povećanja udjela flavonoida. Šic Žlabur i sur. (2016) izolirali su flavonoide pomoću ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (frekvencija 35 kHz, 140 W) iz svježih listova paprene metvice (*Mentha piperita*) i listova matičnjaka (*Melissa officinalis*) tijekom 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minuta. Prinos ukupnih flavonoida povećao se s produljenjem vremena s 5 na 10 minuta u oba uzorka (list matičnjaka i list paprene metvice), što je u skladu s dobivenim rezultatima za uzorak lista planike. Najveći prinos flavonoida određen je u ekstraktima listova matičnjaka i listova paprene metvice ekstrahiranim 25 minuta, pri čemu je ekstrakcija od 30 minuta nepovoljno djelovala na daljnji porast prinosa flavonoida. Potonje

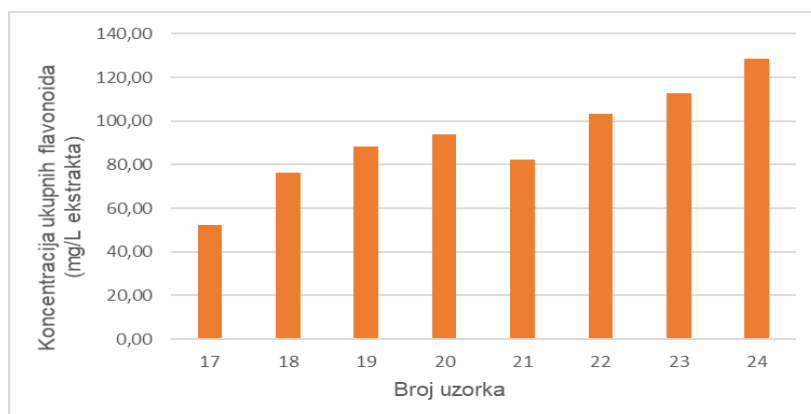
navedeno upućuje na to kako postoji optimalno vrijeme tretmana nakon kojeg može doći do degradacije flavonoida, što rezultira smanjenim prinosom (Sheng i sur., 2013).



a)



b)



c)

Slika 5. Prinos ukupnih flavonoida u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjere korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

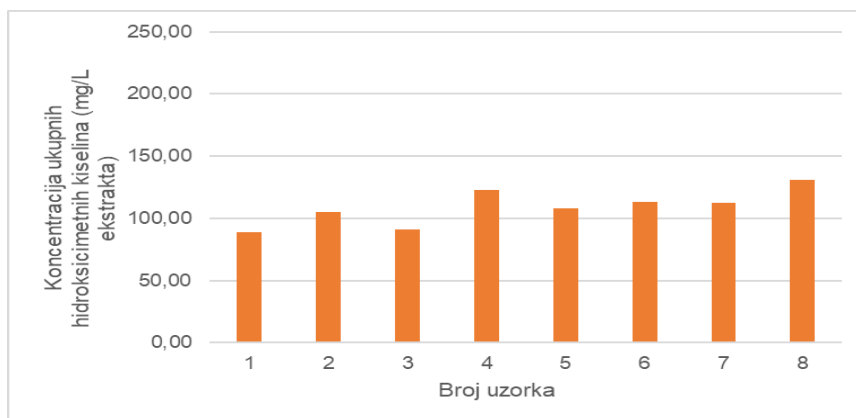
4.3. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

Na slici 6 prikazan je prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina u vodenim ekstraktima listova planike s obzirom na promjer korištene sonde. Ekstrakt s najvećim prinosom hidroksicimetnih kiselina dobiven je uz promjer sonde 22 mm, amplitudu 100 %, puls 100 % i vrijeme 10 minuta (uzorak 24). Ekstrakcijski parametri: promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta, rezultirali su najmanjim prinosom (uzorak 1). Trend prinosa hidroksicimetnih kiselina prati trend fenola i flavonoida gdje je evidentno da se pri najinvasivnijim parametrima ostvaruju najveći prinosi, i obrnuto. Uspoređujući prinose hidroksicimetnih kiselina u odnosu na različite promjere sonde, razlika u prinosu vidljiva je već pri parametrima ekstrakcije: amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta, gdje je veći promjer korištene sonde rezultirao većim prinosom hidroksicimetnih kiselina. Najveće koncentracije hidroksicimetnih kiselina određene su u ekstraktima dobivenim uz promjer sonde 22 mm, a najmanje uz sondu najmanjeg promjera (7 mm).

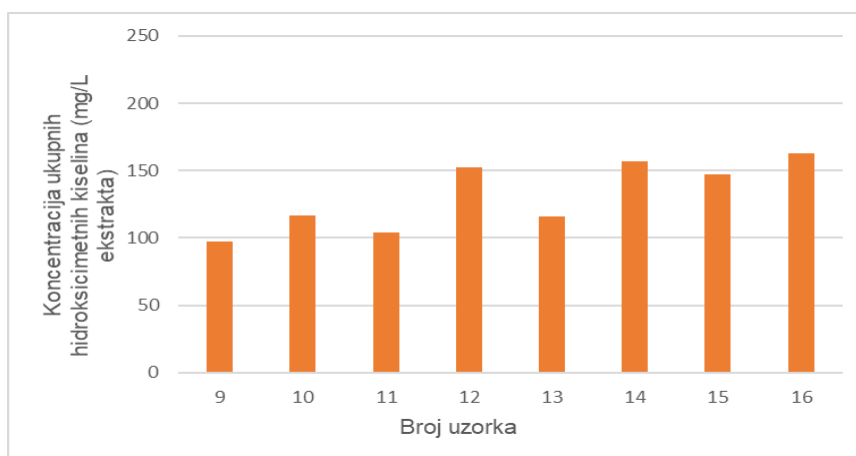
Porast udjela hidroksicimetnih kiselina zabilježen je u svim uzorcima nakon povećanja vrijednosti amplitude s 50 % na 100 %. Bebek Markovinović i sur. (2023) tretirali su sokove od jagoda ultrazvukom visoke snage s ciljem utvrđivanja stabilnosti bioaktivnih spojeva nakon skladištenja istih tijekom 7 dana na 4 °C. Ispitivani parametri ultrazvuka bili su: amplituda 25 %, 50 %, 75 % i 100 %, puls 50 % i 100 %, te vrijeme tretmana 5 i 10 minuta. Zabilježeno je da porastom vrijednosti amplitude dolazi do smanjenja prinosa hidroksicimetnih kiselina te je najmanji prinos ostvaren pri amplitudi 100 %, što je suprotno rezultatima prinosa hidroksicimetnih kiselina dobivenima za list planike.

Neovisno o promjerima ultrazvučnih sonda, prinos hidroksicimetnih kiselina povećava se s povećanjem vrijednosti pulsa. Uz primjenu sonde promjera 22 mm primijećene su slične vrijednosti u prinosima hidroksicimetnih kiselina za uzorak 20 (amplituda 100 %, puls 50 % i vrijeme 10 minuta) i uzorak 21 (amplituda 50 %, puls 100 % i vrijeme tretmana 5 minuta), što upućuje da se povećanjem pulsa pri nižim vrijednostima vremena i amplitude može ostvariti gotovo isti prinos kao pri većim parametrima vremena i amplitude uz nižu vrijednost pulsa. Nadalje, u radu Bebek Markovinović i sur. (2023) nije primjećen utjecaj pulsa kao parametra ekstrakcije na prinos hidroksicimetnih kiselina u sokovima od jagoda, no predlaže se tretman s nižim vrijednostima pulsa, jer vrijednost pulsa od 100 % može biti previše invazivna za stabilnost hidroksicimetnih kiselina. Rezultati Bebek Markovinović i sur. (2023) nisu u skladu s rezultatima dobivenim za list planike jer se povećanjem pulsa sadržaj hidroksicimetnih kiselina povećavao.

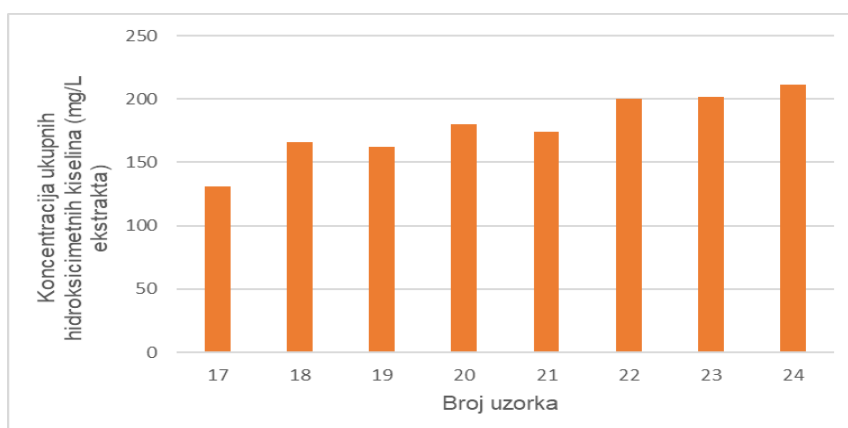
Povećanje vremena ekstrakcije (5 vs. 10 minuta), pozitivno je utjecalo na prinose hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima listova planike. Ipak, rezultati Bebek Markovinović i sur. (2023) upućuju da dulje trajanje ultrazvučnog tretmana (10 minuta vs. 5 minuta) nije imalo učinak na prinos hidroksicimetnih kiselina u sokovima od jagode, dok je u uzorcima planike dulji tretman rezultirao većim prinosom istih.



a)



b)



c)

Slika 6. Prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

4.4.UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH FLAVONOLA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

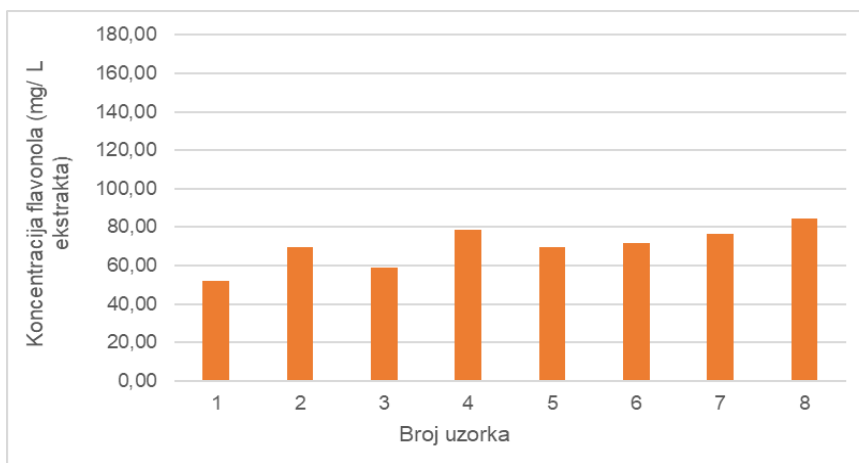
Na slici 7 prikazani su rezultati ukupnog prinosa flavonola s obzirom na promjer korištene sonde tijekom ekstrakcije. Najveći udio ukupnih flavonola dobiven je pri ekstrakcijskim parametrima: promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 % i vrijeme 10 minuta (uzorak 24), dok je najmanji udio dobiven uz promjer sonde 7 mm, amplitudu 50 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta (uzorak 1). Najinvazivnijim parametrima postignut je najveći prinos ukupnih flavonola, što je uočljiv trend i kod prinosa prethodno navedenih bioaktivnih spojeva, i obrnuto.

Promatrajući udjele flavonola u ovisnosti o različitim promjerima sondi, pri navedenim parametrima (amplitude 50 %, pulsa 50 % i vremenu od 5 minuta) su dobivene slične vrijednosti prinosa flavanola uz upotrebu sondi od 7 mm (uzorak 1) i 14 mm (uzorak 9), dok je kod tretmana sa sondom promjera 22 mm (uzorak 17) zabilježen veći prinos flavonola. Daljnjim povećanjem parametara amplitude, pulsa i vremena, vidljiva je razlika u rasponu prinosa u ovisnosti o promjerima sondi, pri čemu je najveći prinos ostvaren uz sonde najvećeg promjera, i obrnuto.

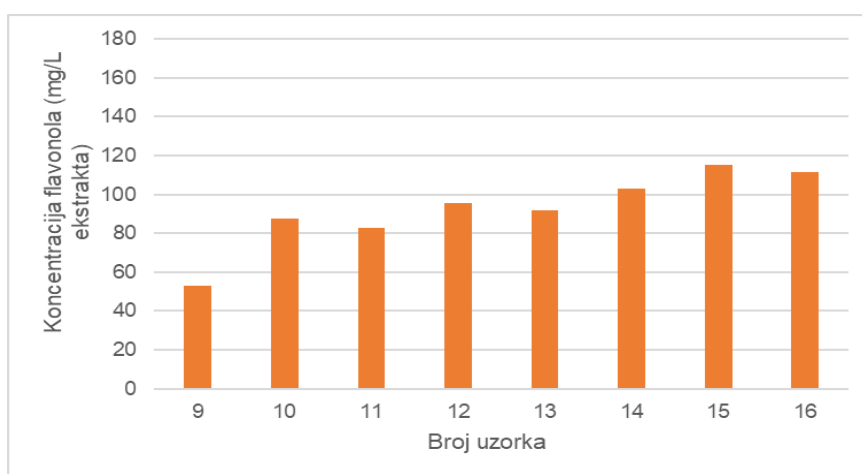
Povećanjem amplitude s 50 % na 100 %, u uzorcima je zabilježen porast udjela flavonola, izuzev uzorka 15 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 16 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta). Mogući razlozi odstupanja od ranije uočenog trenda mogli bi se pripisati analitičkoj pogrešci, oksidaciji uslijed skladištenja ili termičkoj razgradnji spojeva, do čega dolazi uslijed ultrazvučne ekstrakcije. Bebek Markovinović i sur. (2023) su ultrazvukom visoke snage tretirali sokove od jagoda, s ciljem utvrđivanja stabilnosti bioaktivnih spojeva nakon skladištenja istih tijekom 7 dana skladištenja na 4 °C. Parametri ultrazvučne obrade su bili amplituda (25 %, 50 %, 75 % i 100 %), puls (50 %, 100 %) i vrijeme tretmana (5 i 10 minuta). Amplituda nije značajno utjecala na prinos flavonola u sokovima, za razliku od rezultata dobivenih u ovom istraživanju gdje je prinos flavonola u ekstraktima lista planike bio veći uz veće vrijednosti amplitude.

Veća vrijednost pulsa pozitivno utječe na stabilnost flavonola. Između uzorka 12 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 13 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta) uočene su slične vrijednosti prinosa, kao i između uzorka 20 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 21 (promjer sonde 22 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta), što ukazuje na mogućnost ostvarenja istog prinosa povećanjem samo jednog parametra (npr. pulsa) pri nižim parametrima vremena i amplitude. Prema istraživanju Bebek Markovinović i sur. (2023) veći prinos flavonola u sokovima od jagode, ostvaren je pri vrijednosti pulsa 50 %, dok je za ekstrakte lista *A. unedo* povećanje vrijednosti pulsa rezultiralo povećanjem prinosa flavonola.

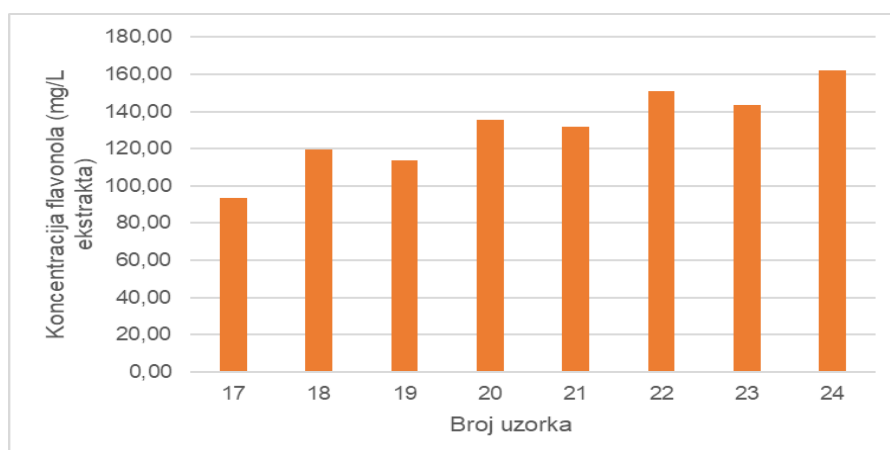
Povećanjem vremena ekstrakcije (5 vs. 10 minuta) dolazi do povećanja prinosa flavonola u svim uzorcima. Bebek Markovinović i sur. (2023) navode u svom radu da je produljeni učinak tretmana negativno utjecao na prinos flavonola u sokovima od jagode, dok je u ekstraktima lista planike s povećanjem vremena ekstrakcije došlo do povećanja prinosa flavonola.



a)



b)



c)

Slika 7. Prinos ukupnih flavonola u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

4.5. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA PRINOS UKUPNIH POLIMERNIH PROANTOCIJANIDINA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

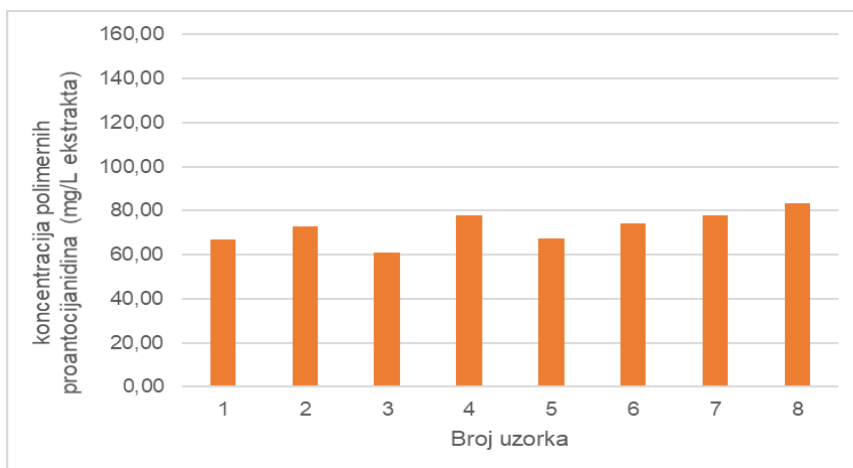
Na slici 8 prikazan je prinos ukupnih polimernih proantocijanidina s obzirom na promjer korištene sonde u vodenim ekstraktima listova *A. unedo*. Ekstrakcijom koja je uključivala primjenu sonde promjera 22 mm, amplitudu 100 %, puls 100 % tijekom 10 minuta, ostvaren je najveći prinos ukupnih polimernih proantocijanidina (uzorak 24), dok je najmanji prinos ostvaren uz sondu promjera 7 mm, amplitudu 50 %, puls 50 % i vrijeme ekstrakcije 10 minuta (uzorak 3). Primjećuje se da invazivniji parametri tretmana pozitivno utječu na prinos polimernih proantocijanida, što je zamijećeno i tijekom ekstrakcije drugih bioaktivnih spojeva, dok se pri blažim uvjetima ostvaruje manji prinos polimernih proantocijanidina. S obzirom na promjer korištene sonde, uz amplitudu 50 %, puls 50 % i vrijeme ekstrakcije 5 minuta, najmanji prinos ostvaren je uz primjenu sonde promjera 22 mm (uzorak 17), a najveći uz primjenu sonde promjera 7 mm (uzorak 1). Daljnjim povećavanjem amplitude, pulsa ili vremena ekstrakcije, dobiveni prinos bio je veći u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu sonde promjera 22 mm, a najmanje vrijednosti u ekstraktima dobivenim uz primjenu sonde promjera 7 mm. U konačnici, najveća koncentracija polimernih proantocijanidina određena je u ekstraktima gdje je korištena sonda promjera 22 mm.

Promotri li se utjecaj amplitude, primijećen je porast udjela polimernih proantocijanidina uz primjenu amplituda viših vrijednosti, izuzev uzorka 15 (promjer sonde 4 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 16 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta). Bebek Markovinović i sur. (2023) obradili su ultrazvukom velike snage sokove od jagoda. Cilj ispitivanja bio je odrediti stabilnost bioaktivnih spojeva nakon skladištenja istih 7 dana na 4 °C. Parametri ultrazvuka: amplituda (25 %, 50 %, 75 % i 100 %), puls (50 %, 100 %) i vrijeme tretmana (5 minuta, 10 minuta) mijenjali su se tijekom eksperimenta te se proučavao njihov utjecaj na bioaktivne spojeve. Prinos polimernih proantocijanidina u sokovima od jagode smanjio se nakon povećanja vrijednosti amplitude, što nije u skladu s većinom rezultata dobivenih za list planike, gdje se javlja povećanje prinosa s povećanjem amplitude.

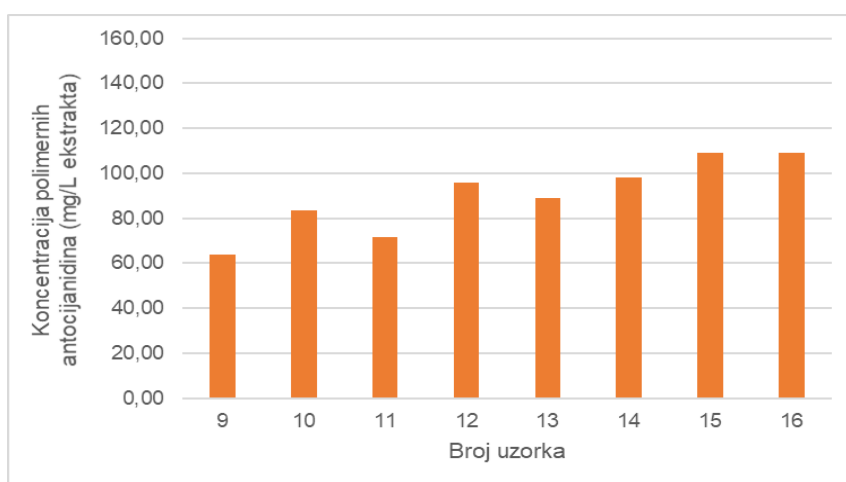
Promjenom vrijednosti pulsa s 50 % na 100 %, u uzorcima je evidentiran porast udjela polimernih proantocijanidina. Bebek Markovinović i sur. (2023) navode da je veći prinos polimernih proantocijanidina iz sokova od jagode dobiven tijekom tretmana pulsom 50 %, dok je za list planike veći prinos ostvaren tijekom tretmana s pulsom od 100 %.

Povećanjem vremena tretmana s 5 na 10 minuta, u ekstraktima listova planike je zabilježen porast prinosa polimernih proantocijanidina, izuzev uzoraka 1 i 3, gdje je veći prinos ostvaren pri kraćem vremenu, dok su ostali parametri bili jednaki (promjer sonde 7 mm,

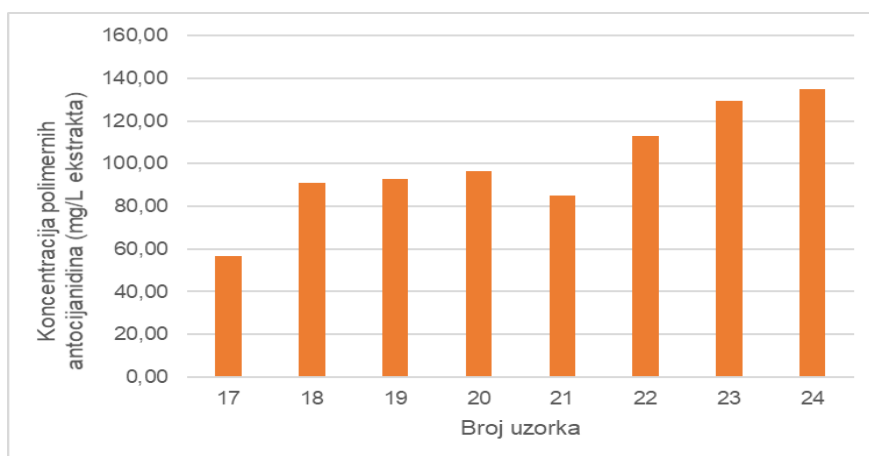
amplituda 50 %, puls 50 %). Prema Bebek Markovinović i sur. (2023) zabilježen je negativan utjecaj dužeg vremena tretmana (10 minuta) na prinos polimernih proantocijanidina, što je suprotno od prinosa dobivenog u listu planike gdje je tijekom tretmana od 10 minuta u većini uzoraka zabilježen veći sadržaj polimernih proantocijanidina.



a)



b)



c)

Slika 8. Prinos ukupnih polimernih proantocijanidina u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

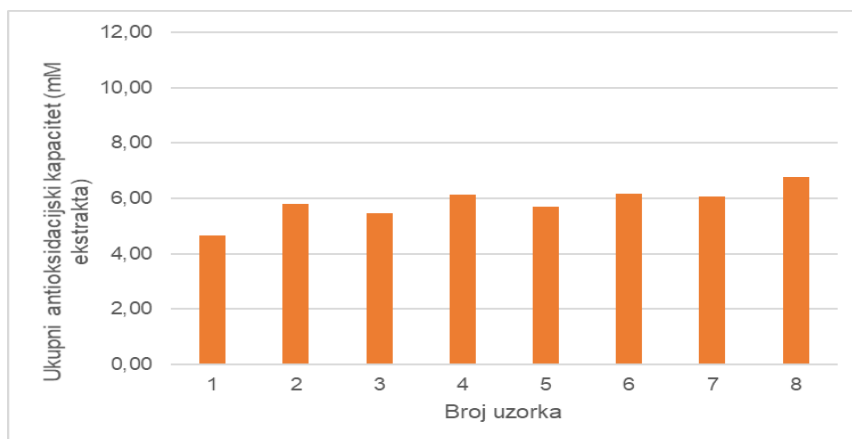
4.6. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN FRAP METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

Na slici 9 prikazan je ukupni antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom s obzirom na promjer korištene sonde tijekom ekstrakcije. Najveća koncentracija određivanjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom dobivena je korištenjem sonde promjera 22 mm, pri amplitudi 100 %, pulsu 100 % i vremenu ekstrakcije 10 minuta (uzorak 24), dok je najmanja koncentracija dobivena uz primjenu sonde promjera 22 mm, amplitudi 50 %, pulsu 50 % i vremenu od 5 minuta (uzorak 17). Promatrajući utjecaj različitih promjera sonda, najveća koncentracija pri početnim parametrima (amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta) određena je u ekstraktima koji su dobiveni uz sondu promjera 14 mm (uzorak 9), a najmanja u ekstraktima dobivenim sa promjerom sonde 22 mm (uzorak 17). Uzorci 10 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta) i 11 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme 10 minuta) imaju manji antioksidacijski kapacitet od uzorka 2 (promjer sonde 7 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) te uzorka 3 (promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta), iako je tijekom ekstrakcije korištena sonda većeg promjera. Također, antioksidacijski kapacitet u ekstraktima dobivenim uz sondu promjera 22 mm, amplitudu 100 %, puls 100 % i vrijeme 5 minuta (uzorak 22), manji je od vrijednosti koja je određena u ekstraktima dobivenim uz sondu promjera 14 mm, amplitudu 100 %, puls 100 % i vrijeme 5 minuta (uzorak 14). Stoga, promjer sonde nije utjecao znatno na antioksidacijski kapacitet. Ipak, najveće vrijednosti su određene u ekstraktima proizvedenim uz promjer sonde 22 mm, amplitudi 100 %, pulsu 100 % i vremenu ekstrakcije 10 minuta (uzorak 24). Dujmić (2015) je izolirao ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom bioaktivne spojeve iz taloga vinskih sorti Vranac i Merlot, a ekstraktima je ispitan antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Varijabilni parametri tokom ekstrakcije bili su: vrijeme (120 s; 322,10 s; 810 s; 1297,90 s; 1500 s), amplituda (30 %; 38,78 %; 60 %; 81,21 %; 90 %) i promjer sonde (7 mm, 22 mm, 40 mm). Najveći antioksidacijski kapacitet ostvaren je u ekstraktima taloga Vranac i Merlot koji su tretirani sondama promjera 22 mm.

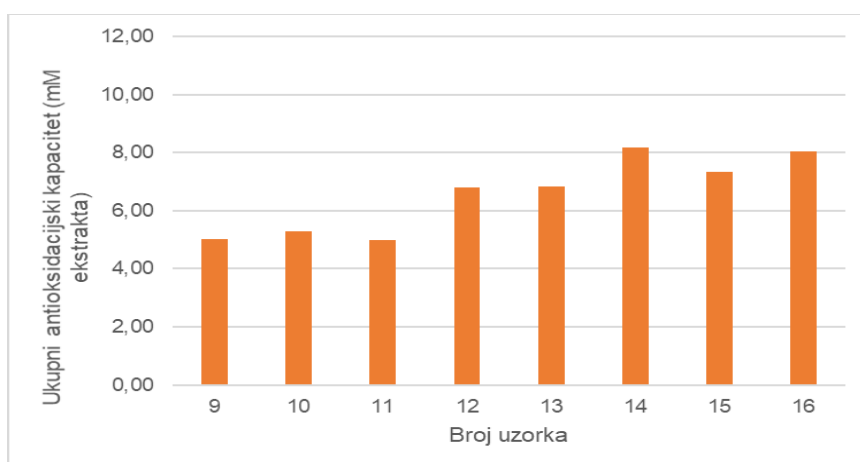
Utjecaj amplitude, kao i pulsa na antioksidacijski kapacitet gotovo je linearan za uzorke lista planike. Dujmić (2015) u svom radu navodi da se s povećanjem amplitude povećava vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta dobivena je korištenjem amplitude 81,21 %. Navedena tvrdnja u skladu je s rezultatima dobivenima za ekstrakte lista *A. unedo*.

Produljenjem vremena ekstrakcije (5 vs. 10 minuta), u uzorcima lista planike došlo je do povećanja antioksidacijskog kapaciteta, osim u uzorku 9 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorku 11 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50

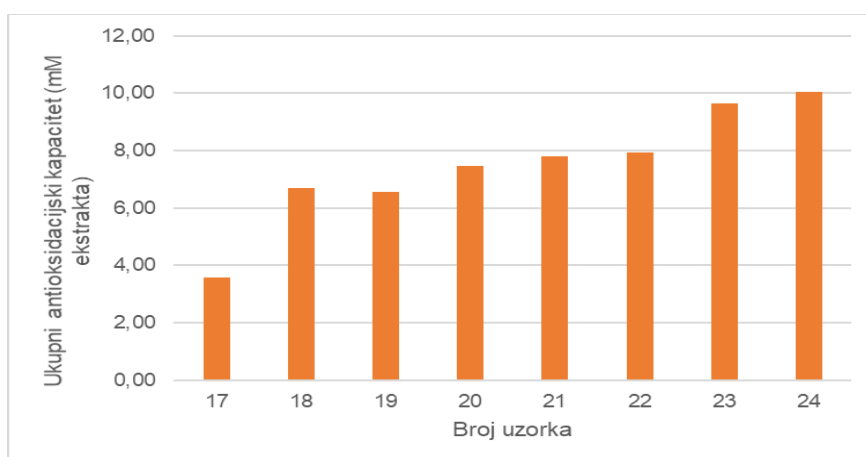
%, vrijeme 10 minuta), koji se razlikuju samo u parametru vremena, a čije su dobivene vrijednosti približne. Dujmić (2015) navodi da je veća vrijednost antioksidacijske aktivnosti dobivena u uzorcima koji su podvrgnuti duljem vremenu ekstrakcije, tj. najveći antioksidacijski kapacitet dobiven je pri trajanju ekstrakcije od 1297,905 sekundi. Navedeno se slaže s rezultatima većine uzoraka dobivenih određivanjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom u uzorcima lista planike.



a)



b)



c)

Slika 9. Ukupni antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

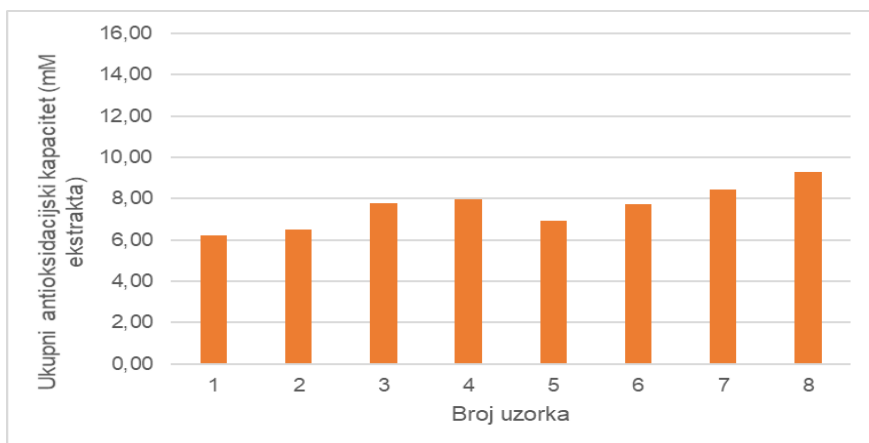
4.7. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN ABTS METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

Na slici 10 prikazani su rezultati ukupnih antioksidacijskih kapaciteta uzoraka određenih ABTS metodom s obzirom na promjer korištene sonde tijekom ekstrakcije. Određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom, najveća vrijednost dobivena je pri uvjetima: promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta (uzorak 14), a najmanja uz uvjete: promjer sonde 22 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta (uzorak 17). Primjena sondi različitih promjera rezultirala je različitim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta, pa su tako ekstrakti ekstrahirani sondom promjera 7 mm imali najmanje ABTS vrijednosti. Promotri li se utjecaj promjera preostale dvije sonde, nije uočena pravilnost te je u nekim ekstraktima veći antioksidacijski kapacitet ostvaren uz promjer sonde 14 mm, a u nekima uz promjer sonde 22 mm. Šic Žlabur i sur. (2015) određivali su antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista *Stevie rebaudiane Bertoni* ABTS metodom. Tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom korištene su sonde promjera 7 mm i 22 mm te vrijeme ekstrakcije od 2, 4, 8 i 10 minuta. Vrijednosti dobivene tretmanom uz sondu promjera 22 mm veće su od onih dobivenih tretmanom uz sondu promjera 7 mm. Navedeno se ne podudara s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta za list planike gdje promjena promjera sonde tijekom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije ne prati pravilan trend povećanja ili smanjenja vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određivanog ABTS metodom.

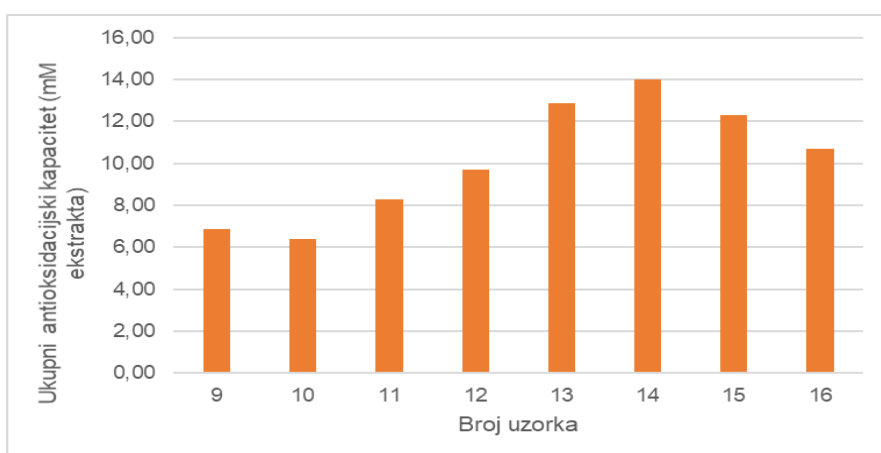
U većini slučajeva, povećanjem vrijednosti amplitude došlo je do povećanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima, izuzev uzorka 9 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 10 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta), uzorka 15 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 16 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta), uzorka 21 (promjer sonde 22 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 22 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta) te uzorka 23 (promjer sonde 22 mm, amplituda 50 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) i uzorka 24 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta), gdje je vidljivo da je povećanje amplitude rezultiralo smanjenjem ABTS vrijednosti. Gómez-Cruz i sur. (2021) su iz komine masline određivali antioksidacijski kapacitet uzorka ABTS metodom, s obzirom na variranje vrijednosti amplitude (30 %, 50 %, 70 %) tijekom tretmana sirovine ultrazvukom i ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Najveći antioksidacijski kapacitet iz komine dobiven je pri vrijednosti amplitude 70 %, no u nekim uzorcima došlo je do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta nakon povećanja vrijednosti amplitude, što se podudara s rezultatima dobivenima za list planike.

Povećanjem vrijednosti pulsa, u ekstraktima listova planike je došlo do povećanja vrijednosti ukupnog antioksidacijskog kapaciteta, izuzev uzorka 18 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 22 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta) koji su, osim pulsa, međusobno jednaki po svim ostalim parametrima.

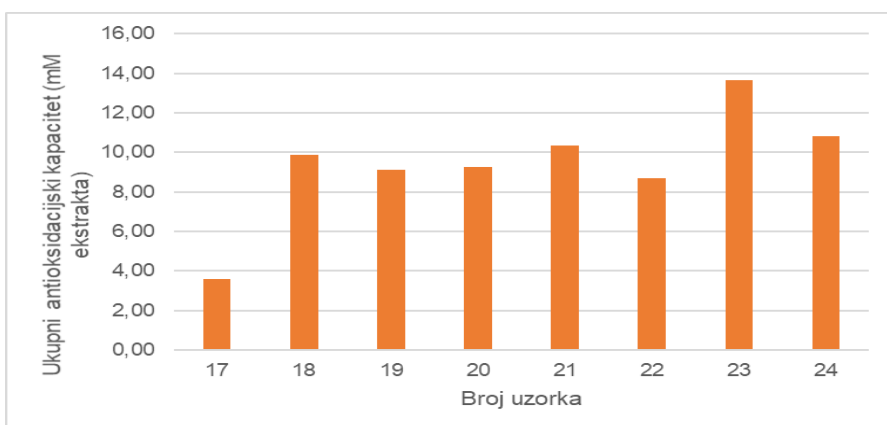
S povećanjem vremena ekstrakcije u većini ekstrakata zamijećeno je povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta, izuzev uzorka 13 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 15 (promjer sonde 14 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 10 minuta), uzorka 14 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 16 (promjer sonde 14 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta) te uzorka 18 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta) i uzorka 20 (promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 50 %, vrijeme 10 minuta) čijom je usporedbom vidljivo da je veća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena pri kraćem trajanju ekstrakcije (5 minuta). Šic Žlabur i sur. (2016) ispitali su antioksidacijski kapacitet ABTS metodom uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom iz svježih listova paprene metvice (*Mentha piperita*) i listova matičnjaka (*Melissa officinalis*). Ekstrakcija je provedena uz frekvenciju 35 kHz i snagu 140 W, tijekom 5, 10, 15, 20, 25 i 30 min. Tijekom povećanja vremena s 5 minuta na 10 minuta došlo je do manjeg povećanja antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima listova matičnjaka i paprene metvice, što je u skladu s većinom dobivenih rezultata za uzorak lista planike tijekom određivanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom. Šic Žlabur i sur. (2016) odredili su najveći antioksidacijski kapacitet u uzorcima matičnjaka i paprene metvice tijekom tretmana od 25 minuta, dok se nakon 30 minuta antioksidacijski kapacitet značajno smanjio. Štoviše, između ukupnih fenolnih spojeva (flavonoida i neflavonoida) paprene metvice i antioksidacijske aktivnosti, utvrđen je visok stupanj pozitivne korelacije (Šic Žlabur i sur., 2016).



a)



b)



c)

Slika 10. Ukupni antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

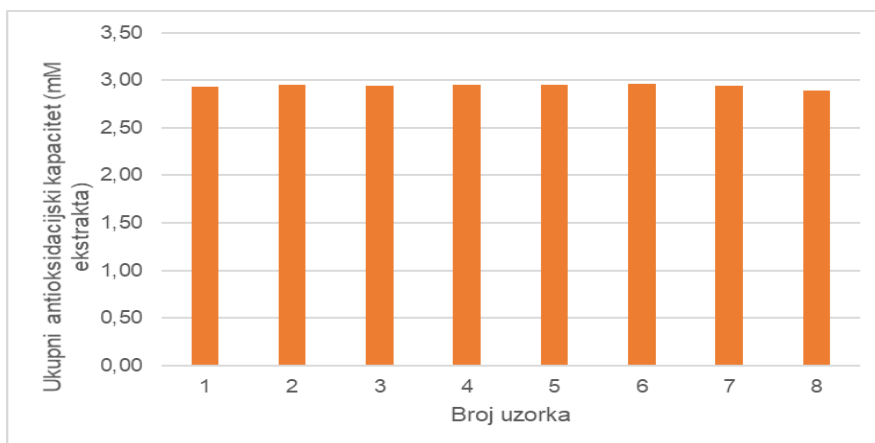
4.8. UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNUTE EKSTRAKCIJE NA UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN DPPH METODOM U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA PLANIKE

Na slici 11 prikazan je ukupni antioksidacijski kapacitet određivan DPPH metodom s obzirom na promjer korištene sonde tijekom ekstrakcije. Najveće DPPH vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivene su pri parametrima sonde promjera 7 mm, amplitude 50 %, pulsa 100 % i vremena ekstrakcije 5 minuta (uzorak 5) te pri parametrima promjera sonde 7 mm, amplitude 100 %, pulsa 100 % i vremena ekstrakcije 5 minuta (uzorak 6). Najmanja vrijednost dobivena je pri parametrima: promjer sonde 22 mm, amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta (uzorak 17). S obzirom na promjere korištenih sondi, uz amplitudu 50 %, puls 50 % i vrijeme 5 minuta, najveća vrijednost dobivena je korištenjem sonde promjera 7 mm, a najmanja korištenjem sonde promjera 22 mm. Uspoređujući ekstrakte koji se razlikuju samo prema procesnom parametru promjera sonde, najveće vrijednosti dobivene su uz sondu promjera 7 mm. Uspoređujući uzorke tretirane sondama promjera 14 mm i 22 mm, u većini slučajeva su veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene ekstrakcijom sa sondom promjera 22 mm. Dujmić (2015) je ispitivao antioksidacijski kapacitet DPPH metodom u talozima vinskih sorti Vranac i Merlot. Tijekom ekstrakcije mijenjali su se parametri vremena (120 s; 322,10 s; 810 s; 1297,90 s; 1500 s), amplitude (30 %; 38,78 %; 60 %; 81,21 %; 90 %) i promjera sonde (7 mm, 22 mm, 40 mm). U pogledu korištene sonde, najveći antioksidacijski kapacitet ostvaren je u uzorcima taloga Vranac i Merlot koji su tretirani sondama promjera 22 mm. Navedeno se ne podudara s dobivenim rezultatima za uzorke lista planike jer su najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određivane DPPH metodom postignute s najmanjim korištenim promjerom sonde (7 mm).

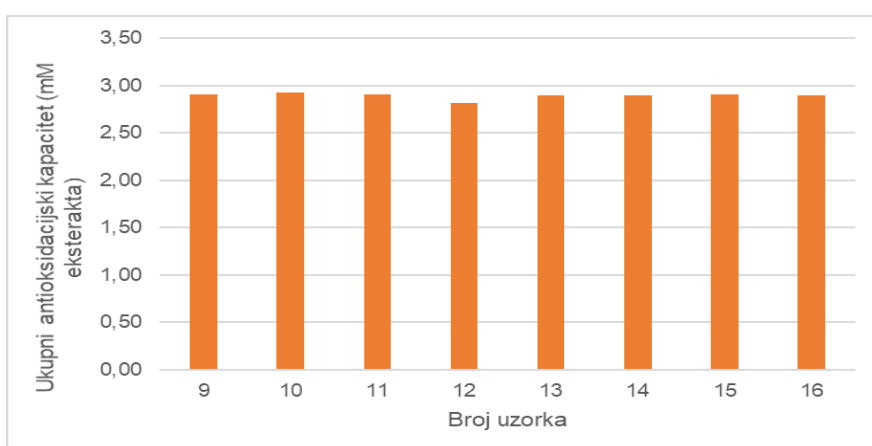
Promjena vrijednosti amplitude s 50 % na 100 %, sukladno dobivenim rezultatima ukazuje da nije došlo do znatnijih odstupanja u vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta. Dujmić (2015) navodi da povećanje amplitude pozitivno utječe na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta taloga sorti Vranac i Merlot, te je najveća vrijednost zabilježena pri amplitudi 81,21 %. Uočeno je da, na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom, najznačajniji utjecaj ima parametar amplitude (Dujmić, 2015). Navedeno se ne poklapa s dobivenim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određivanog DPPH metodom za list planike, jer se s povećanjem amplitude s 50 % na 100 % ne prati trend povećanja antioksidacijskog kapaciteta u većini uzoraka, nego je vrijednost najčešće nepromjenjena.

Što se tiče utjecaja vrijednosti pulsa na antioksidacijski kapacitet, u većini uzoraka zabilježeno je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta s povećanjem pulsa (42 % od ukupnog broja uzoraka). U nekim uzorcima zabilježeno je i povećanje vrijednosti (25 % od ukupnog broja uzoraka), a neke vrijednosti ostale su nepromijenjene (33 % od ukupnog broja uzoraka).

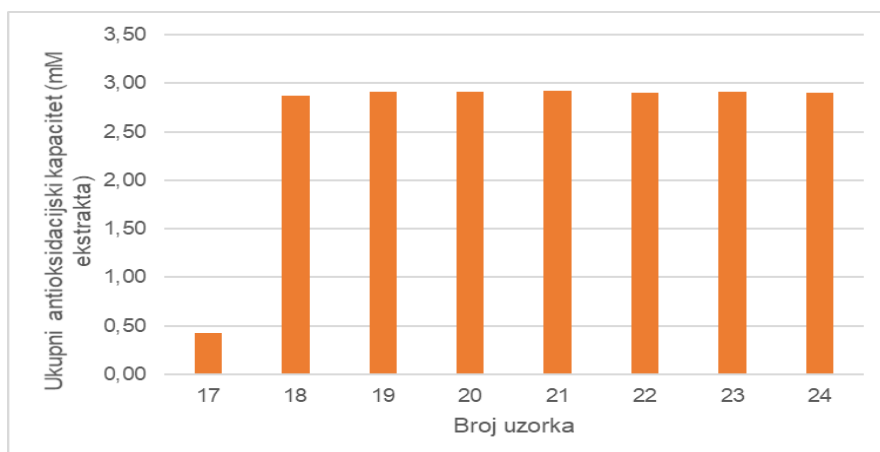
Produljenjem vremena tretmana, u najvećem broju uzoraka došlo je do smanjenja DPPH vrijednosti. Prema Dujmiću (2015), s obzirom na vrijeme ekstrakcije zabilježen je porast antioksidacijske aktivnosti s porastom vremena tretmana u uzorcima taloga sorti Vranac i Merlot, te je najveća vrijednost postignuta pri 1297,905 s (Dujmić, 2015). Navedeni rezultati ne slažu se s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju gdje u većini uzoraka uz produljenje ekstrakcije dolazi do smanjenja vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom.



a)



b)



c)

Slika 11. Ukupni antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u vodenim ekstraktima lista planike s obzirom na promjer korištene sonde tijekom tretmana: a) promjer 7 mm, b) promjer 14 mm, c) promjer 22 mm.

5. ZAKLJUČCI

1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pogodna je metoda za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, polimernih proantocijanidina) uz povoljan učinak na ukupni antioksidacijski kapacitet istih (FRAP, ABTS i DPPH metoda). Varijabilni parametri u procesu (promjer sonde, amplituda, puls, vrijeme) utječu na vrijednosti prinosa bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta.
2. Najveći prinos bioaktivnih spojeva (fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, polimernih proantocijanidina) ostvaruje se pri najinvalzivijim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: promjer sonde 22 mm, amplituda 100 %, puls 100 %, vrijeme 10 minuta. Najmanji prinos fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola dobiven je pri parametrima: promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 %, vrijeme 5 minuta. Najmanji prinos polimernih proantocijanidina određen je pri parametrima: promjer sonde 7 mm, amplituda 50 %, puls 50 % i vrijeme 10 minuta. Tijekom određivanja antioksidacijskog kapaciteta nije uočen utjecaj invazivnosti parametara na ukupni antioksidacijski kapacitet.
3. Većim promjerom sonde (22 mm vs., 7 mm i 14 mm) ostvaren je veći prinos bioaktivnih spojeva i ukupni antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom. Veće DPPH vrijednosti dobivene su uz promjer sonde 7 mm, dok na vrijednosti ABTS utjecaj promjera sonde nije uočen.
4. Većom amplitudom (100 % vs. 50 %) dobiven je veći prinos bioaktivnih spojeva i ukupni antioksidacijski kapacitet određen FRAP i ABTS metodom. Nije uočen utjecaj amplitude na DPPH vrijednosti.
5. Veća vrijednost pulsa (100 % vs. 50 %) rezultirala je većim udjelom bioaktivnih spojeva i većim ukupnim antioksidacijskim kapacitetom (FRAP, ABTS), dok su se, u većini ekstrakata DPPH vrijednosti smanjile.
6. Duže vrijeme ekstrakcije (10 minuta vs. 5 minuta) rezultiralo je većim prinosom bioaktivnih spojeva kao i većim ukupnim antioksidacijskim kapacitetom dobivenim FRAP i ABTS metodom, dok su niže vrijednosti zabilježene za ukupni antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom.
7. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija može se uspješno primijeniti za izolaciju antioksidativnih bioaktivnih spojeva iz lista *Arbutus unedo* L. s potencijalom za daljnju industrijsku primjenu.

6. LITERATURA

Alexandre AMCR, Serra AT, Matias AA, Duarte CMM, Bronze MR (2020) Supercritical fluid extraction of *Arbutus unedo* distillate residues – Impact of process conditions on antiproliferative response of extracts. *J. CO₂ Util.* **37**, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.11.002>

Alupului A, Calinescu I, Lavric V (2009) Ultrasonic vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants. U: Icheap-9: 9Th International Conference On Chemical And Process Engineering, Rim, str. 1023-1028. <https://doi.org/10.3303/CET0917171>

Amarillo M, Perez N, Blasina F, Gambaro A, Leone A, Romaniello R i sur. (2019) Impact of sound attenuation on ultrasound-driven yield improvements during olive oil extraction. *Ultrason. Sonochem.* **53**, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.044>

Ameer K, Shahbaz HM, Kwon JH (2017) Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **16**, 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>

Arvanitoyannis IS, Kotsanopoulos KV, Savva AG (2017) Use of ultrasounds in the food industry-Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **57**, 109–128. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.860514>

Asmaa N, Abdelaziz G, Boulanouar B, Carbonell-Barrachina A, Cano-Lamadrid M, Noguera-Artiaga L (2019) Chemical composition, antioxidant activity and mineral content of *Arbutus unedo* (leaves and fruits). *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **8**, 1335–1339. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.6.1335-1339>

Barros L, Carvalho AM, Sá Morais J, Ferreira ICFR (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120**, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>

Bayramoglu B, Sahin S, Sumnu G (2008) Solvent-free microwave extraction of essential oils from oregano. *J. Food Eng.* **88**, 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.015>

Bebek Markovinović A, Brčić Karačonji I, Jurica K, Lasić D, Skendrović Babojelić M, Duralija B i sur. (2022) Strawberry Tree Fruits and Leaves (*Arbutus unedo* L.) as Raw Material for Sustainable Functional Food Processing: A Review. *Horticulturae* **8**, 881. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100881>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Bičanić P, Brdar D, Duralija B, Pavlić B i sur. (2023) A Chemometric Investigation on the Functional Potential in High Power Ultrasound (HPU)

Processed Strawberry Juice Made from Fruits Harvested at two Stages of Ripeness. *Molecules* **28**,138. <https://doi.org/10.3390/molecules28010138>

Bellumori M, Innocenti M, Binello A, Boffa L, Mulinacci N, Cravotto G (2016) Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound-and microwave-assisted extraction procedures. *C. R. Chim.* **19**, 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.013>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **29** , 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(96\)00091-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(96)00091-6)

Berka-Zougali B, Hassani A, Besombes C, Allaf K (2010) Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6134–6142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.080>

Berka-Zougali B, Hassani A, Besombes C, Allaf K (2010) Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant pressure drop technology. *J. Chromatogr. A*. **1217**, 6134–6142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.080>

Bhadange YA, Saharan VK, Sonawane SH, Boczkaj G (2022) Intensification of catechin extraction from the bark of *Syzygium cumini* using ultrasonication: Optimization, characterization, degradation analysis and kinetic studies. *Chem. Eng. Process.* **181**, 109147. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.109147>

Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F (2009) A new process for extraction of essential oil from citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *J. Food Eng.* **90**, 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.034>

Bouyahya A, Moussaoui N, Abrini J, Bakri Y, Dakka N (2016) Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *Br. Biotechnol. J.* **14**, 1–10. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/26488>

Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>

Brčić Karačonji I, Jurica K, Gašić U, Dramićanin A, Tešić Ž, Milojković Opsenica D (2022) Comparative study on the phenolic fingerprint and antioxidant activity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves and fruits. *Plants* **11**, 25. <https://doi.org/10.3390/plants11010025>

Brunner G (2005) Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *J. Food Eng.* **67**, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>

- Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>
- Cappadone C, Mandrone M, Chiocchio I, Sanna C, Malucelli E, Bassi V i sur. (2019) Antitumor potential and phytochemical profile of plants from Sardinia (Italy), a hotspot for biodiversity in the Mediterranean basin. *Plants* **9**, 26. <https://doi.org/10.3390/plants9010026>
- Carcache-Blanco EJ, Cuendet M, Park EJ, Su BN, Rivero-Cruz JF, Farnsworth NR i sur. (2006) Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Nat. Prod. Res.* **20**, 327–334. <https://doi.org/10.1080/14786410500161205>
- Carrea C, Ruiz-Rodriguez A, Palma M, Barroso GC (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta.* **732**, 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Perez P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M i sur. (2021) Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* **18**, 9153. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *JFDA* **10**, 178-182. <http://dx.doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chethana S, Nayak CA, Raghavarao KSMS (2007) Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *J. Food Eng.* **81**, 679–687. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021>
- Coimbra AT, Luís ÂFS, Batista MT, Ferreira SMP, Duarte APC (2020) Phytochemical characterization, bioactivities evaluation and synergistic effect of *Arbutus unedo* and *crataegus monogyna* extracts with amphotericin B. *Curr. Microbiol.* **77**, 2143–2154. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02125-w>
- Ćurko N, Kelšin K, Jambrak AR, Tomašević M, Gracin L, Poturica V i sur. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma

compounds of red wines. *Croatian J. Food Sci. Technol.* **9**, 136–144.
<https://doi.org/10.17508/CJFST.2017.9.2.08>

de Falco B, Grauso L, Fiore A, Bonanomi G, Lanzotti V (2022) Metabolomics and chemometrics of seven aromatic plants: Carob, eucalyptus, laurel, mint, myrtle, rosemary and strawberry tree. *Phytochem. Anal.* **33**, 696–709. <https://doi.org/10.1002/pca.3121>

Derbassi N, Pedrosa MC, Heleno S, Fernandes F, Dias MI, Calhelha RC i sur. (2022) *Arbutus unedo* leaf extracts as potential dairy preservatives: case study on quark cheese. *Food Funct.* **13**, 5442. <https://doi.org/10.1039/d1fo04158d>

Dib MA, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert JM i sur. (2010) Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 721. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500721>

Ding Y, Ma H, Wang K, Azam SMR, Wang Y, Zhou J i sur. (2021) Ultrasound frequency effect on soybean protein: Acoustic field simulation, extraction rate and structure. *LWT* **145**, 111320. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111320>

Dujmić F (2015) Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih sastojaka iz taloga crnih vina (disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G i sur. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci.* **35**, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

El Haouari M, Assem N, Changan S, Kumar M, Da,stan SD, Rajkovic J i sur. (2021) An insight into phytochemical, pharmacological, and nutritional properties of *Arbutus unedo* L. from Morocco. *Evid. Based Complement. Altern.* **2021**, 1794621. <https://doi.org/10.1155/2021/1794621>

El Haouari M, López JJ, Mekhfi H, Rosado JA, Salido GM (2007) Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.016>

Fiorentino A, Castaldi S, D'Abrosca B, Natale A, Carfora A, Messere A i sur. (2007) Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochem. Syst. Ecol.* **35**, 809–811. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.04.005>

Fu X, Belwal T, Cravotto G, Luo Z (2020) Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food

components. *Ultrason. Sonochem.* **60**, 104726.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>

Giacometti J, Kovacevic DB, Putnik P, Gabric D, Bilusic T, Kresic G i sur. (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int.* **113**, 245–262.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>

Giovannetti M, Lioi L (1990) The mycorrhizal status of *Arbutus unedo* in relation to compatible and incompatible fungi. *Can. J. Bot.* **68**, 1239–1244.
<https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/b90-156>

Gomes F, Simões M, Lopes ML, Canhoto JM (2010) Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnol.* **27**, 882–892. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.009>

Gómez-Cruz I, del Mar Contreras M, Carvalheiro F, Duarte LC, Roseiro LB, Romero I i sur. (2021) Recovery of Bioactive Compounds from Industrial Exhausted Olive Pomace through Ultrasound Assisted Extraction. *Biology* **10**, 514. <http://dx.doi.org/10.3390/biology10060514>

Habachi E, Bettaieb Rebey I, Dakhlaoui S, Hammami M, Sawsen S, Msaada K i sur. (2022) *Arbutus unedo*: Innovative Source of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Tyrosinase Phenolics for Novel Cosmeceuticals. *Cosmetics* **9**, 143.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics9060143>

Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW (2021) The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. U: IOP Conference Series Earth and Environmental Science, **755**, 12060.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012060>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Huang L, Ding X, Li Y, Ma H (2019) The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid. *Food Chem.* **279**, 114–119.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.147>

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2009) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* **62**, 1–20.
<https://doi.org/10.1080/01635580903191585>

- Iida Y, Tuziuti T, Yasui K, Towata A, Kozuka T (2008) Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.029>
- Irakli M, Chatzopoulou P, Ekateriniadou L (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Ind. Crops. Prod.* **124**, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070>
- Jin J, Ma H, Wang B, Yagoub AEGA, Wang K, He R i sur. (2016) Effects and mechanism of dual-frequency power ultrasound on the molecular weight distribution of corn gluten meal hydrolysates. *Ultrason. Sonochem.* **30**, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.021>
- Jun X (2009) Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *J. Food Eng.* **94**, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.003>
- Jurica K (2016) Phenolic Compounds in Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) and Their Biological Effects (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Jurica K, Benković V, Sikirić S, Brčić Karačonji I, Kopjar N (2018e) The effects of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin upon kidney function and primary DNA damage in renal cells of rats. *Nat. Prod. Res.* **34**, 2354–2357. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1534106>
- Jurica K, Benković V, Sikirić S, Kopjar N, Brčić Karačonji I (2018d) Liver function and DNA integrity in hepatocytes of rats evaluated after treatments with strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin. *Drug Chem. Toxicol.* **43**, 127–137. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1477794>
- Jurica K, Brčić Karačonji I, Gobin I (2018a) Medicinal herbs and herbal preparations for the treatment of urinary infections. *Med. Flum.* **54**, 262–267. https://doi.org/10.21860/medflum2018_203551
- Jurica K, Brčić Karačonji I, Kopjar N, Shek-Vugrovečki A, Cikač T, Benković V (2018c) The effects of strawberry tree water leaf extract, arbutin and hydroquinone on haematological parameters and levels of primary DNA damage in white blood cells of rats. *J. Ethnopharmacol.* **215**, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.039>
- Jurica K, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Milojković-Opsenica D, Benković V, Kopjar N (2018b) In vitro safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology* **70**, 1261–1278. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0218-4>

- Jurica K, Gobin I, Kremer D, Cepo DV, Grubešić RJ, Karačonji IB i sur. (2017) Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J. Herb. Med.* **8**, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.006>
- Kachkoul R, Squalli Housseini T, Mohim M, El Habbani R, Miyah Y, Lahrichi A (2019) Chemical compounds as well as antioxidant and litholytic activities of *Arbutus unedo* L. leaves against calcium oxalate stones. *J. Integr. Med.* **17**, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.08.001>
- Kang Q, Chen S, Li S, Wang B, Liu X, Hao L i sur. (2018) Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *Int. J. Biol. Macromol.* **124**, 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.215>
- Khadhraoui B, Turk M, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Robinet P, Imbert R i sur. (2018) Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. Towards chain detexturation mechanism. *Ultrason. Sonochem.* **42**, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.029>
- Kivcak B, Mert T, Demirci B, Baser KHC (2001) Composition of the essential oil of *Arbutus unedo* L. *Chem. Nat. Compd.* **37**, 445–446. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014419309885>
- Kobus Z, Krzywicka M, Pecyna A, Buczaj A (2021) Process efficiency and energy consumption during the ultrasound-assisted extraction of bioactive substances from hawthorn berries. *Energies* **14**, 7638. <https://doi.org/10.3390/en14227638>
- Koukos D, Meletiou-Christou MS, Rhizopoulou S (2015) Leaf surface wettability and fatty acid composition of *Arbutus unedo* and *Arbutus andrachne* grown under ambient conditions in a natural macchia. *Acta Bot. Gall.* **162**, 225–232. <https://doi.org/10.1080/12538078.2015.1039579>
- Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, Apaliya MT, Sackey AS, Wu M i sur. (2018) Impact of ultrasonication and pulsed light treatments on phenolics concentration and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *LWT.* **92**, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.016>
- Legssyer A, Ziyat A, Mekh H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V i sur. (2004) Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytother. Res.* **18**, 889–894. <https://doi.org/10.1002/ptr.1513>
- Linnaei C (1753) *Species Plantarum, Laurentii Salvii*, Stockholm, str. 395.

- Lloyd PJ, van Wyk J (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (ured.) Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton/ London/ New York, str. 22.
- Loginova KV, Vorobiev E, Bals O, Lebovka NI (2011) Pilot study of countercurrent cold and mil heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields. *J. Food Eng.* **102**, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.010>
- Maldini M, D'Urso G, Pagliuca G, Petretto GL, Foddai M, Gallo FR i sur. (2019) HPTLC-PCA complementary to HRMS-PCA in the case study of *Arbutus unedo* antioxidant phenolic profiling. *Foods* **8**, 294. <https://doi.org/10.3390/foods8080294>
- Males Z, Plazibat M, Vundac VB, Zuntar I (2006) Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree–*Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*). *Acta Pharm.* **56**, 245–250.
- Malheiro R, Sá O, Pereira E, Aguiar C, Baptista P, Pereira JA (2012) *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* **37**, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.023>
- Martins J, Batista T, Pinto G, Canhoto J (2021) Seasonal variation of phenolic compounds in Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves and inhibitory potential on *Phytophthora cinnamomi*. *Trees* **35**, 1571–1586. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02137-4>
- Mehmood A, Ishaq M, Zhao L, Yaqoob S, Safdar B, Nadeem M i sur. (2019) Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.). *Ultrason. Sonochem.* **51**,12-19. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.013>
- Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M (2011) Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 2285–2291. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.028>
- Miguel M, Faleiro M, Guerreiro A, Antunes M (2014) *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules* **19**, 15799–15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>
- Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Ruiz K, Hamieh T, Chemat F (2017) Extraction of green absolute from thyme using ultrasound and sunflower oil. *Resour.-Effic. Technol.* **3**,12–21. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.01.007>
- Niazi S, Hashemabadi SH, Noroozi S (2014) Numerical simulation of operational parameters and sonoreactor configurations for the highest possibility of acoustic cavitation in crude oil. *Chem. Eng. Commun.* **201**,1340–1359. <https://doi.org/10.1080/00986445.2013.808999>

- Nipornram S, Tochampa W, Rattanatraiwong P, Singanusong R (2018) Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chem.* **241**, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>
- Niranjan K, Hanmoungjai P (2004) Enzyme-aided aqueous extraction. U: Dunford NT, Dunford HB (ured.) Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing Champaign, AOCS Publishing, New York, <https://doi.org/10.1201/9781003040293>
- Nn A (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *J. Appl. Res. Med. Aroma.* **4**, 1–6. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA (2011) *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J. Food Nutr. Res.* **50**, 73–85.
- Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P (2009) Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1507–1511. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.042>
- Oliveira I, Nunes A, Lima A, Borralho P, Rodrigues C, Ferreira R i sur. (2019) New lectins from Mediterranean flora. Activity against HT29 colon cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3059. <https://doi.org/10.3390/ijms20123059>
- Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinçi N (2011) Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1249–1256. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0172-9>
- Osorio-Tobo'n JF (2020) Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.* **57**, 4299-4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Pan ZL, Qu WJ, Ma HL, Atungulu GG, McHugh TH (2011) Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 1249–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>
- Pan ZL, Qu WJ, Ma HL, Atungulu GG, McHugh TH (2012) Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason. Sonochem.* **19**, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.015>
- Panadare DC, Gondaliya A, Rathod VK (2020) Comparative study of ultrasonic pretreatment and ultrasound assisted three phase partitioning for extraction of custard apple seed oil. *Ultrason. Sonochem.* **61**, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104821>

- Panda D, Manickam S (2019) Cavitation technology-the future of greener extraction method: a review on the extraction of natural products and process intensification mechanism and perspectives. *Appl. Sci.-Basel.* **9**, 766. <https://doi.org/10.3390/app9040766>
- Preece KE, Hooshyar N, Krijgsman A, Fryer PJ, Zuidam NJ (2017) Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chem. Eng. Process.* **113**, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.003>
- Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Qiu L, Zhang M, Chitrakar B, Bhandari B (2020) Application of power ultrasound in freezing and thawing Processes: Effect on process efficiency and product quality. *Ultrason. Sonochem.* **68**, 105230. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105230>
- Ranjha MMAN, Irfan S, Lorenzo JM, Shafique B, Kanwal R, Pateiro M i sur. (2021) Sonication, a potential technique for extraction of phytoconstituents: a systematic review. *Processes* **9**, 1406. <https://doi.org/10.3390/pr9081406>
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Reverchon E (2003) Supercritical fluid extraction. U: Cabelloro B, Finglas P, Trugo L (ured.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. izd., Elsevier Science Ltd. (online) str. 5680–5687.
- Rodrigues S, Fernandes FAN (2017) Extraction processes assisted by ultrasound. U: Bermudez-Aguirre D (ured.) *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation*, Elsevier Inc., New York, str. 351–368.
- Sanjust E, Mocci G, Zucca P, Rescigno A (2008) Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Nat. Prod. Res.* **22**, 689–708. <https://doi.org/10.1080/14786410801997125>
- Shen L, Pang S, Zhong M, Sun Y, Qayum A, Liu Y i sur. (2023) A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrason. Sonochem.* **101**, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Sheng ZL, Wan PF, Dong CL, Li YH (2013) Optimization of total flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology, *Industrial Crops and Products* **43**, 778-786. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.020>

- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP, (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Shotipruk A, Kaufman B, Wang Y (2001) Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnol. Prog.* **17**, 924–928. <https://doi.org/10.1021/bp010074u>
- Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/JF980366J>
- Šić Žlabur J, Bogdanović S, Voća S, Skendrović Babojelić M (2020) Biological potential of fruit and leaves of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from Croatia. *Molecules* **25**, 5102. <https://doi.org/10.3390/molecules25215102>
- Šić Žlabur J, Voća S, Dobričević N, Brnčić M, Dujmić F, Rimac Brnčić S (2015) Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* **29**, 231-237. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0017>
- Šić Žlabur J, Voća S, Dobričević N, Pliestić S, Galić A, Boričević A i sur. (2016) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *Int. Agrophys.* **30**, 95-104. <http://dx.doi.org/10.1515/intag-2015-0077>
- Tavares L, Fortalezas S, Carrilho C, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB i sur. (2010) Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *J. Berry Res.* **1**, 3–12. <http://dx.doi.org/10.3233/BR-2010-001>
- Temelli F (2009) Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J. Supercrit. Fluids* **47**, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.014>
- Tenuta MC, Deguin B, Loizzo MR, Dugay A, Acquaviva R, Malfa GA i sur. (2020) Contribution of flavonoids and iridoids to the hypoglycaemic, antioxidant, and nitric oxide (NO) inhibitory activities of *Arbutus unedo* L. *Antioxidants* **9**, 184. <https://doi.org/10.3390/antiox9020184>
- Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trac-Trend Anal. Chem.* **71**, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Tomé Constantino AB, Garcia-Rojas EE (2020) Modifications of physicochemical and functional properties of amaranth protein isolate (*Amaranthus cruentus* BRS Alegria) treated with high-intensity ultrasound. *J Cereal Sci.* **95**, 103076. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103076>

Trinajstić I (2008) Plant Communities of the Republic of Croatia, Akademija šumarskih znanosti, Zagreb.

Tzanakis I, Eskin DG, Georgoulas A, Fytanidis DK (2014) Incubation pit analysis and calculation of the hydrodynamic impact pressure from the implosion of an acoustic cavitation bubble. *Ultrason. Sonochem.* **21**, 866–878. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.10.003>

Üstündağ M, Yener HB, Helvacı ŞŞ (2018) Parameters Affecting Lycopene Extraction from Tomato Powder and Its Antioxidant Activity. *Anadolu University Journal of Science and Technology-A Applied Sciences and Engineering* **19**, 454–467. <http://dx.doi.org/10.18038/aubtda.363140>

Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Poklar Ulrih N (2013) The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **5**, 29–33.

Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trac-Trend Anal. Chem.* **97**, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>

Wang C, Yang H, Li J (2021) Combination of microwave, ultrasonic, enzyme assisted method for curcumin species extraction from turmeric (*Curcuma Longa* L.) and evaluation of their antioxidant activity. *eFood* **2**, 73–80. <https://doi.org/10.2991/efood.k.210329.001>

Wen CT, Zhang JX, Zhang HH, Dzah CS, Zandile M, Duan YQ i sur. (2018) Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops - A review. *Ultrason. Sonochem.* **48**, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>

Xiang W, Peng M, Wang ZH, Yang QI, Peng S (2020) Ultrasound-microwave assisted extraction of flavonoid compounds from *Eucommia ulmoides* leaves and an evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Arch. Biol. Sci.* **72**, 211–221. <https://doi.org/10.2298/ABS191216015W>

Xu Y, Guo Y, Duan S, Wei H, Liu Y, Wang L i sur. (2018) Effects of ultrasound irradiation on the characterization and bioactivities of the polysaccharide from blackcurrant fruits. *Ultrason. Sonochem.* **49**, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.005>

Yang RF, Geng LL, Lu HQ, Fan XD (2017a) Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina baroni*. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.037>

Yang X, Li Y, Li S, Oladejo AO, Wang Y, Huang S i sur. (2017b) Effects of low power density multi-frequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrason. Sonochem.* **38**, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001>

- Yang X, Li Y, Li S, Oladejo AO, Ruan S, Wang Y i sur. (2017c) Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrason. Sonochem.* **38**, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.026>
- Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller, CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>
- Yusoff IM, Taher ZM, Rahmat Z, Chua LS (2022) A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Res. Int.* **151**, 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Zhang L, Wang X, Hu Y, Fakayode OA, Ma H, Zhou C i sur. (2021) Dual-frequency multi-angle ultrasonic processing technology and its real-time monitoring on physicochemical properties of raw soymilk and soybean protein. *Ultrason. Sonochem.* **80**, 105803. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105803>
- Zhang QA, Shen H, Fan XH, Shen Y, Wang X, Song Y (2015) Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution. *Ultrason. Sonochem.* **22**, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.06.010>
- Zhu W, Xue X, Zhang Z (2016) Ultrasonic-assisted extraction, structure and antitumor activity of polysaccharide from Polygonum multiflorum. *Int. J. Biol. Macromol.* **91**, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.061>
- Zhu Y, Sun J, Xu D, Wang S, Yuan Y, Cao Y (2018) Investigation of (+)-catechin stability under ultrasonic treatment and its degradation kinetic modeling. *J. Food Process Eng.* **41**, 12904.
- Zhu Z, Guan Q, Koubaa M, Barba FJ, Roohinejad S, Cravotto G i sur. (2017) HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. *Food Chem.* **215**, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.157>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis