

Optimizacija ekstrakcije polifenolnih spojeva i pigmentata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.) primjenom ultrazvuka

Jurković, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:852246>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marijana Jurković
1081/PI

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA I
PIGMENTATA IZ LISTA KOPRIVE
(*Urtica dioica* L.) PRIMJENOM
ULTRAZVUKA**



Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma (HRZZ PlantiBioPower, IP-01-2018-4924)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Zorana Zorića te uz pomoć izv.prof.dr.sc. Danijele Bursać Kovačević i Valentine Kruk, mag.ing.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA I PIGMENATA IZ LISTA KOPRIVE (*Urtica dioica* L.) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Marijana Jurković, 1081/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bila je optimizacija vremena ekstrakcije i amplitude ultrazvuka na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva, klorofila *a* i *b* te karotenoida iz listova koprive primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj frekvenciji od 26 kHz i promjeru sonde (2 mm), a izvori varijacije bili su: amplituda ultrazvuka (25, 50, 75 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta). Optimalnim uvjetima za ekstrakciju ukupnih fenola pokazalo se vrijeme ekstrakcije od 40 minuta pri amplitudi od 75 %. Isto vrijeme je optimalno i za ekstrakciju klorofila *a*, ali pri amplitudi 100 %. Za ekstrakciju klorofila *b* i karotenoida, optimalno vrijeme je 30 minuta te amplituda 75 %. Navedeni optimalni uvjeti pokazuju da je za ekstrakciju ukupnih fenola i klorofila *a* bolja duža ekstrakcija pri višim amplitudama, dok je za ekstrakciju klorofila *b* i karotenoida bolje provesti kraću ekstrakciju pri nešto nižim amplitudama ultrazvuka.

Ključne riječi: *kopriva, ultrazvuk, ekstrakcija, polifenoli, pigmenti*

Rad sadrži: 42 stranice, 20 slika, 8 tablica, 78 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Doc.dr.sc. Zoran Zorić*

Pomoć pri izradi: *Izv.prof.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević i Valentina Kruk, mag.ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Maja Repajić*
2. Doc.dr.sc. *Zoran Zorić*
3. Doc.dr.sc. *Sandra Pedisić*
4. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Balbino* (zamjena)

Datum obrane: 19. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND – ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND PIGMENTS FROM NETTLE LEAVES (*Urtica dioica* L.)

Marijana Jurković, 1081/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal conditions for efficiency of phenolic compounds, chlorophyll *a* and *b* and carotenoids isolation using ultrasound – assisted extraction from nettle leaves. The extraction was performed at constant frequency (24 kHz) and the 2 mm probe. Sources of variation were: the amplitude (25, 50, 75 and 100 %) and the extraction time (5, 10, 15, 20, 30 and 40 minutes). Results showed that optimal conditions for phenolic compounds extraction were the extraction time 40 min and 75 % amplitude. The same time was optimal for chlorophyll *a* extraction, but the amplitude was 100 %. For chlorophyll *b* and carotenoids the optimal extraction time was 30 min and 75 % amplitude. These optimal conditions indicate that is better to use longer time and higher amplitude for phenolic compounds and chlorophyll *a* extraction, but for the extraction of chlorophyll *b* and carotenoids shorter time and lower amplitude show better results.

Keywords: *nettle, ultrasound, extraction, phenolics, pigments*

Thesis contains: 42 pages, 20 figures, 8 tables, 78 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Zoran Zorić, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Full professor and Valentina Kruk, M.E.*

Reviewers:

1. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
2. PhD. *Zoran Zorić*, Assistant professor
3. PhD. *Sandra Pedisić*, Assistant professor
4. PhD. *Sandra Albino*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 19th, 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOPRIVA (<i>Urtica dioica</i> L.).....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV KOPRIVE	4
2.2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI KOPRIVE	4
2.2.2. KAROTENOIDI	7
2.2.3. KLOROFILI.....	8
2.2.4. OSTALI SPOJEVI U KOPRIVI.....	9
2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE KOPRIVE	10
2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	12
2.4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.2. METODE RADA.....	19
3.2.1. PRIPREMA UZORKA	19
3.2.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (UAE)	19
3.2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	22
3.2.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KLOROFILA A, KLOROFILA B I UKUPNIH KAROTENOIDA	24
3.2.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE.....	30
4.1.1. UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE	32
4.1.2. UTJECAJ AMPLITUDE ULTRAZVUKA.....	33
4.1.3. KOMBINIRANI UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE I AMPLITUDE ULTRAZVUKA .	33
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) pripada porodici Urticaceae (koprivovke, koprivnjače). To je višegodišnja, dvodomna, zeljasta trajnica općeprihvaćena kao ljekovita biljka u mnogim zemljama svijeta. Posjeduje blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje zahvaljujući bogatom kemijskom sastavu. Sadrži značajan udio vitamina (A, C, riboflavin, K) i minerala (željezo, kalcij, magnezij, natrij), a sadrži i fenolne spojeve, tanine, fitosterole, karotenoide, lecitin te klorofil. Osim toga, ima i značajnu antioksidacijsku aktivnost te tako doprinosi očuvanju zdravlja organizma od autoimunih, neurodegenerativnih, kroničnih nezaraznih bolesti i raka.

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, a u preradi hrane definira se kao prijenos jedne ili više bioloških tvari iz materijala u tekuću fazu. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije uzevši u obzir sve parametre. Osim toga, prilikom odabira adekvatne metode potrebno je razmotriti dostupnost tehnike ekstrakcije, čistoću ekstrakta, prinos ekstrakcije i potrošnju energije. U posljednje vrijeme sve su više zastupljene nove tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom, suprekritičnim fluidima, pulsirajućim električnim i magnetskim poljem. Prednosti novih tehnologija vidljive su u samoj brzini ekstrakcije, prinosu ekstrakcije, manjem utrošku energije i ekološkoj prihvatljivosti u odnosu na konvencionalne tehnologije.

Jedna od često primjenjivanih novih tehnika je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE). Za vrijeme tretiranja ultrazvukom, kavitacija uzrokuje bubrenje stanica i rupturu staničnih stjenki te omogućuje učinkovitije oslobađanje staničnog materijala. Da bi postupak ekstrakcije ultrazvukom dao što veći prinos, potrebno je optimizirati ekstrakcijske parametre: frekvencija (kHz), amplituda (%), vrijeme (min), izlazna snaga (W) i promjer sonde (mm).

Stoga, svrha ovoga rada bila je optimizacija vremena ekstrakcije i amplitude ultrazvuka na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva, klorofila *a* i *b* te karotenoida iz listova koprive primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom). Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj frekvenciji od 26 kHz i promjeru sonde (2 mm), a izvori varijacije bili su: amplituda ultrazvuka (25, 50, 75 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.)

Kopriva (*Urtica dioica* L.) pripada porodici Urticaceae (koprivovke, koprivnjače). To je višegodišnja, dvodomna, zeljasta trajnica čija je visina u rasponu od 50 cm do 1,5 m (Slika 1). U narodu je poznata i pod nazivima žariga, žarulja, žegavica, žeža, žigovica, koprva, obična kopriva, pasja kopriva, pasja kupina i pitoma kopriva. Postoje brojni varijeteti koprive poput male, mrtve i mediteranske koprive (Grlić, 1990). Kopriva je ljudima poznata još od davnina, a raste u umjerenim klimatskim uvjetima u mnogim područjima Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Nalazimo je u ruralnim područjima, vrtovima, uz rubove šuma, rijeka i potoka, gdje raste kao korov (Krystofova i sur., 2010). Kopriva cvate od svibnja do rujna, a doba njene cvatnje varira ovisno o podneblju, temperaturi i vlazi (Ahmed i Parsuraman, 2016).

Latinski naziv koprive *Urtica dioica* potječe od riječi *urere* što znači „opeći“ zbog žarnih dlaka koje rastu po cijelom nadzemnom dijelu koprive i riječi *dioica* što znači „dva doma“ jer biljka obično ima i muške i ženske cvjetove na jednoj stabljici (dvodomna biljka).



Slika 1. Kopriva (Anonymous 1, 2019)

Kopriva je mnogima poznata po svojim žarnim dlakama na površini listova i stabljike koje u dodiru s kožom izazivaju lokalnu iritaciju kože i osjećaj žarenja najčešće popraćenog dermatitisom i crvenim urtikama (urtikarija). Žarne dlake imaju višestaničnu parenhimsku bazu iz koje izlazi jedna duguljasta cjevasta stanica (oko 2 mm) i glavicu koja sadrži iritans kao zaštitu od biljojeda (Slika 2). Stijenka duge stanice je jako čvrsta za razliku od male glavice koja se lako odlomi pri dodiru. Tada iz nje izlazi iritans u obliku tekućine koja sadrži acetilkolin, mravlju kiselinu, 5 – hidroksitriptamin i histamin koji izazivaju opisane promjene na koži (Fu i sur., 2006).



Slika 2. Žarna dlaka na listu koprive (Repić, 2014)

Unazad nekoliko godina, kopriva je općeprihvaćena kao ljekovita biljka u mnogim zemljama svijeta zbog mnogih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Ahmed i Parsuraman, 2016).

Od morfoloških obilježja prikazanih na Slici 3. važno je spomenuti da iz puzavog trajnog korjena izbijaju uspravne dlakave četverbridaste stabljike. Stabljike su najčešće nerazgranate, zelene i ponekad ljubičaste (Schafner i sur., 2004).



Slika 3. *Urtica dioica* (Anonymous 2, 2019)

Četverbridasta stabljika ima po nekoliko nakupina žila koje se nalaze u svakome uglu, a vlaknaste stanične stijenke stabljike deblje su od ostatka biljke. Po dva tamnozeleno lista izbijaju iz jednog čvora stabljike. Listovi su međusobno nasuprotni, dlakavi, nazubljeni, šiljati i srcoliki. Cvjetovi koprive su sitni, zelenkasti i simetrični. Oblikuju resaste cvatove koji

sadrže međusobno razdvojene 4 latice i 4 lapa. Cvat je dulji od susjednih peteljki. Muški cvjetovi mogu biti žute boje, a ženski su ljubičasti. Plod je plosnat, gladak i zelenkasto – smeđ. Sadrži jednu smeđu sjemenku koja u potpunosti ispunjava plod. Eliptičnog je oblika i dugačak je oko 1 - 1,5 mm te širok 0,7 - 0,9 mm (Joshi i sur., 2014).

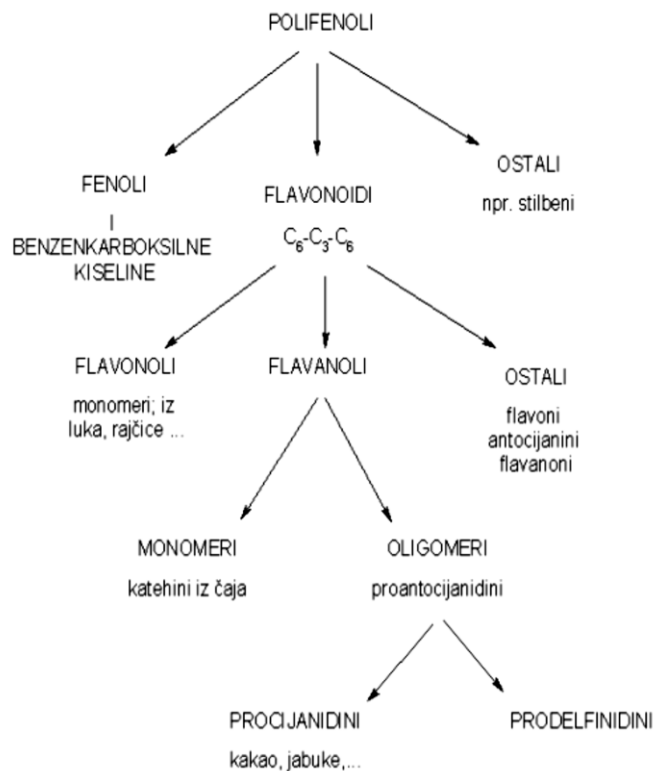
2.2. KEMIJSKI SASTAV KOPRIVE

Kopriva ima bogat kemijski sastav te uz značajan sadržaj vitamina (A, C, riboflavin, K) i minerala (željezo, kalcij, magnezij, natrij) sadrži i fenolne spojeve, tanine, fitosterole, karotenoide, lecitin te klorofil (Otlis i Yalcin, 2012).

2.2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI KOPRIVE

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u većini biljaka te namirnicama biljnog podrijetla. Oni su najbrojnija skupina spojeva u biljnom “kraljevstvu” sa oko 8000 različitih spojeva. Jaki su antioksidansi te doprinose prevenciji kroničnih nezaraznih i autoimunih bolesti. Uključuju spojeve različite kemijske strukture čija je osnova aromatski prsten s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). U biljnom tkivu imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu. Obično se nalaze vezani na druge molekule poput ugljikohidrata (glikozidi). Osim hidroksilnih, na polifenolne spojeve mogu biti vezane sulfatne ili acetilne skupine.

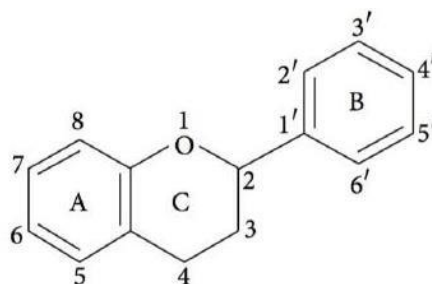
Polifenoli se dijele na flavonoidne i neflavonoidne spojeve (Slika 4). U skupinu flavonoida spadaju flavonoli, flavanoli, flavan – 3 – oli, flavani, flavoni, izoflavoni, antocijanidini i čalkoni koji se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog aromatskog prstena (Berend i sur., 2012). U neflavonoidne spojeve spadaju fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline i njihovi derivati), lignani te stilbeni (Riedel i sur., 2012).



Slika 4. Osnova podjela polifenola (Berend i sur., 2008)

FLAVONOIDI

Bazu flavonoida čini ugljični skelet od 15 C atoma koji grade 2 benzenska prstena (A i B) povezna heterocikličnim piranskim prstenom (C). Skupine se razlikuju prema stupnju oksidacije i supstituentima piranskog prstena (C) dok se spojevi unutar iste skupine razlikuju prema supstituciji prstena A i B. Pojavljuju se kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati (Kazazić, 2004) (Slika 5).



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (Kazazić, 2004)

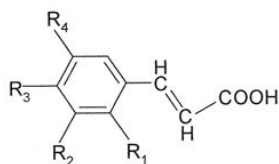
U ljudskoj prehrani u najvećem udjelu se nalaze izoflavoni, flavonoli i flavoni. Apsorpcija prehrambenih flavonoida ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima poput veličine čestica,

topljivosti, lipofilnosti i pKa. Nakon apsorpcije, flavonoidi se konjugiraju u jetri sulfatima, metilnim skupinama, glukuronizacijom ili se metaboliziraju do manjih fenolnih spojeva (Kazazić, 2004; Ivanova i sur., 2011).

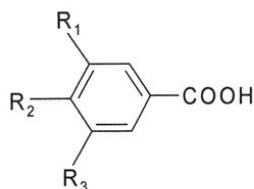
Flavonoidi prisutni u svježim listovima i cvjetovima koprive su flavonoli i to: kamferol, izoramnetin i kvercetin te njihovi 3 – glikozidi. Flavonoidi pronađeni u korijenu koprive su isoramnetin, katehin, kamferol, kvercetin, miricetin, naringin i rutin. (Spina i sur., 2008).

FENOLNE KISELINE

Za razliku od flavonoida, fenolne kiseline u svojoj kemijskoj strukturi sadrže samo jedan aromatski prsten (Slike 6 i 7). Najzastupljeniji su derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Goncalves i sur., 2013).



Slika 6. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)



Slika 7. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

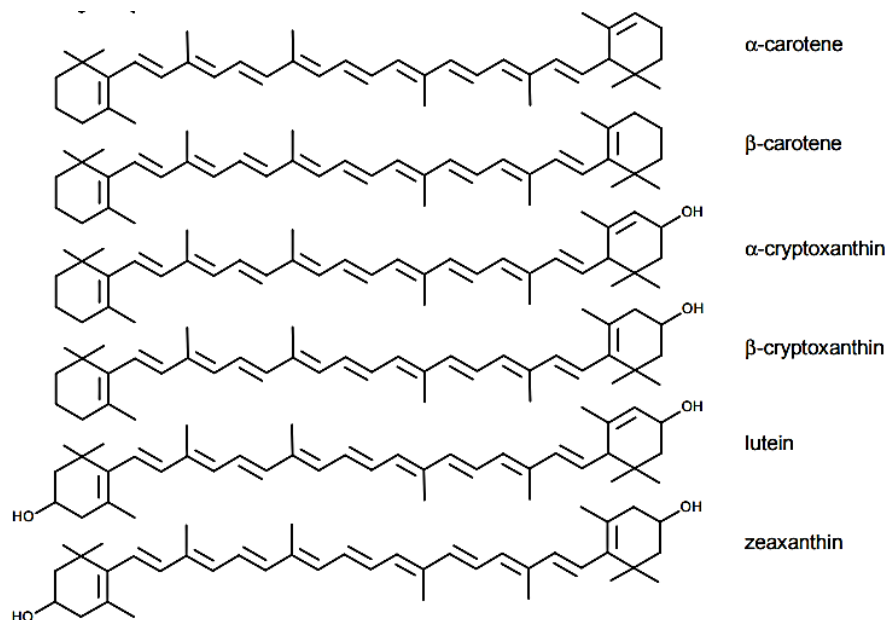
U koprivi su prisutne fenolne kiseline koje uključuju kava kiselinu, klorogensku i kaveomaličnu kiselinu (do 1,8 %). U listovima je također ustanovljena prisutnost kumarina skopoletina. Klorogenska i kaveomalična kiselina čine čak 71,5 % ukupne količine fenola u 1,5 g uzgojenog zelenog biljnog materijala koprive odnosno 76,5 % u 1,5 g samoniklog biljnog materijala prikupljenog u prirodi (Upton, 2013).

2.2.2. KAROTENOIDI

Karotenoidi su izrazito lipofilni derivati izoprena s velikim brojem konjugiranih dvostrukih veza. Dijelev se na karotene i ksantofile. U karotene spadaju α , β i γ – karoten te likopen. Ksantofili su hidroksi, keto i metoksi derivati karotena.

U prirodi su najviše prisutni u *trans* obliku. Središnji dio molekule čini dug niz konjugiranih dvostrukih veza (Slika 8). Imaju važnu ulogu u zaštiti od svjetlosti i fotosintezi, a cijenjeni su i zbog provitaminskih i antioksidativnih učinaka (Lelas, 2008).

Jedna od važnijih karakteristika karotenoida je njihova jaka obojenost kao posljedica apsorpcije svjetlosti koja proizlazi zbog prisutnosti velikog broja konjugiranih dvostrukih veza. Ta pojava je ključna za pravilno funkcioniranje karotenoida koji apsorbiraju svjetlost u fotosintetskim organizmima i štite sve organizme od svjetlosti. Osim toga, karotenoidi sudjeluju u: stimulaciji imunološkog sustava, modulaciji unutarstaničnih signalnih puteva, regulaciji staničnog ciklusa i apoptozi, modulaciji faktora rasta, staničnoj diferencijaciji i modulaciji velikog broja receptora te mnogih drugih fizioloških procesa (Fiedor i Burda, 2014).



Slika 8. Karotenoidi (Fiedor i Burda, 2014)

Glavni karotenoid prisutan u listovima koprive je β – karoten na čiju koncentraciju značajno utječe vrijeme ubiranja biljnog materijala i način obrade što je prikazano u Tablici 1. Od

ostalih karotena, u koprivi se nalaze i: hidroksi – α – karoten (0,9 %), lutoksanin (10,3 %), lutein epoksid (13,1 %) i violaksanin (14,7 %) (HMPC, 2012).

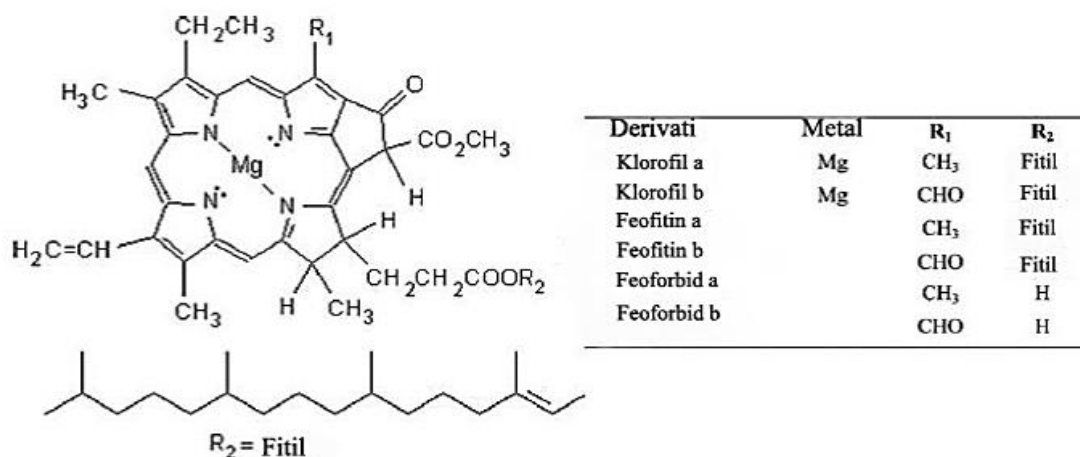
Tablica 1. Količina β – karotena prisutna u koprivi (HMPC, 2012)

UZORAK	m (β -karoten) [mg 100 g ⁻¹]
Svježi listovi	2,95-8
Sušeni mladi listovi	20,2
Sušeni listovi ubrani u svibnju	25-300
Sušeni listovi ubrani u rujnu	2,5

2.2.3. KLOROFILI

Klorofil je svjetlozeleni pigment koji se nalazi u fotosintetskim biljkama i određenim bakterijama (Slika 9). Razlikuje se 5 vrsta klorofila: *a*, *b*, *c*, *d* i *e*. Klorofili *a* i *b* su najzastupljeniji u svim višim biljkama, dok *c*, *d*, i *e* derivate nalazimo u fotosintetskim algama i diatomskim vrstama uključujući crvenu, smeđu te žuto-zelenu algu. Osim toga, četiri vrste bakterioklorofila su izolirani u fotosintetskim bakterijama, od toga bakterioklorofili *a* i *b* prevladavaju u ljubičastim bakterijama dok su *c* i *d* pronađeni u zelenim i ljubičastim sumpornim bakterijama (Feruzzi i Schwartz, 2001).

Odnos između klorofila *a* i *b* je 31:11 (Lelas, 2008). Molekula klorofila sastoji se od četiri pirolna prstena koja su vezana preko metenskih mostova. Okosnicu klorofila čini spoj porfirin u čijem se centru nalazi magnezijev ion. Hidrolizom klorofila nastaje smeđe obojeni feofitin (Lelas, 2008).



Slika 9. Različite strukture klorofila prisutne u voću i povrću (Ferruzzi i Schwartz, 2001)

Promjene boje nastale hidrolizom klorofila odnose na vidljivu promjenu boje tkiva povrća od zelene do maslinasto – smeđe što je zabilježeno tijekom toplinskih procesa i/ili zakiseljavanja. Opisani gubitak boje zapravo je rezultat zamjene središnjeg keliranog magnezijevog atoma s dva atoma vodika uz nastajanje derivata feofitina bez metala. Blaži uvjeti prerade također rezultiraju promjenom glavnih derivata klorofila. Formacija C10 epimera izvorne strukture klorofila je pronađena tijekom zamrzavanja, sušenja i blanširanja. Stvaranje epimera nema štetnih učinaka jer su spektralna svojstva epimera jednaka onim u njihovoj izvornoj molekuli klorofila. Važnost boje u konačnoj percepciji kvalitete prehrambenih proizvoda doprinijela je tendenciji očuvanja izvorne zelene boje. Fishbach (1943) i Schanderl sa suradnicima (1965) prvi su zapazili stvaranje cinkovih i bakrenih feofitina i zabilježili njihovu povećanu toplinsku stabilnost i sličnost boje obzirom na prirodni klorofil. Od tada su posvećeni veliki naponi u razumijevanju stvaranja cinkovih i bakrenih klorofilnih kompleksa u svrhu stabilizacije boje u procesiranoj hrani. Također, utvrđeno je da se dodatkom soli cinka i bakra prije termičke obrade u komercijalnom konzerviranju povrća ubrzava proces njihovog stvaranja što doprinosi poželjnoj zelenoj boji gotovog proizvoda (Ferruzzi i Schwartz, 2001).

Klorofil *a* primarni je fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosustava i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku. U sekundarne metabolite, zbog pomoćne i zaštitne uloge, ubrajamo sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente (Taiz i Zeiger, 2010). Klorofili imaju anti – mutagenu i antioksidacijsku aktivnost zbog sposobnosti prekidanja lančane reakcije slobodnih radikala uzrokovane autooksidacijom putem mehanizma u kojemu je vodik donor (Ferruzzi i sur., 2002).

Kopriva sadrži značajnu količinu klorofila. U svježim listovima ona iznosi 0,008 – 0,3 %, a u propisno osušenim i samljevenim listovima 0,6 – 1 % (Upton, 2013).

2.2.4. OSTALI SPOJEVI U KOPRIVI

MASNE KISELINE

U listovima koprive prisutne masne kiseline su: palmitinska (6,8 %), stearinska (1,1 %), oleinska (3,6 %), linolenska (20,2 %) i linolna kiselina (12,4 %). Linolenska kiselina je dominantna masna kiselina listova, a plodovi su bogatiji linolnom kiselinom (Guil Guerrero i sur., 2003).

FITOSTEROLI

Fitosteroli (biljni steroli) su važne sastavnice biljnih membrana (stabiliziraju fosfolipidni dvosloj), a po strukturi su triterpeni. Većina fitosterola sadrži 28 ili 29 ugljikovih atom te jednu ili dvije dvostruke veze. Za razliku od fitosterola, fitostanoli su potpuno zasićena podskupina fitosterola. Fitosteroli se kemijskom hidrogenacijom mogu konvertirati u fitostanole. U biljnim vrstama pronađeno je više od 200 različitih tipova fitosterola. Osim u slobodnom obliku, fitosteroli se nalaze i u obliku konjugata esterificiranih s masnom kiselinom, hidroksicimnom kiselinom ili su glikolizirani heksozom (glukozom). Važni su u ljudskom organizmu jer doprinose snižavanju kolesterola (Moreau i sur., 2002).

Najpoznatiji fitosteroli korijena koprive su: β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol (Hirano i sur., 1993).

VITAMINI I MINERALI

Kopriva ima značajan udio vitamina C (20-60 mg/100 g suhog lista), riboflavina i vitamina K (0,16-0,64 mg/100 g), a sadrži i značajnu količinu željeza, kalcija, magnezija i kalija prikazanu u Tablici 2. (Joshi i sur., 2014).

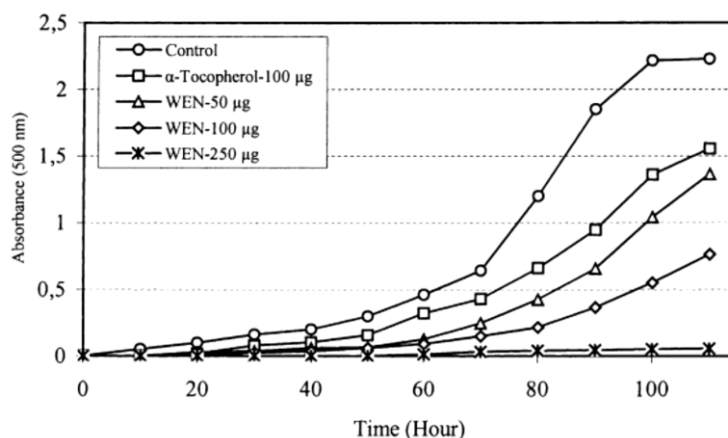
Tablica 2. Minerali prisutni u koprivi (Joshi i sur., 2014)

MINERAL	m (suhog lista) [mg 100 g⁻¹]
Željezo	2 – 200
Kalcij	835 – 1050
Magnezij	175
Kalij	532 - 613

2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE KOPRIVE

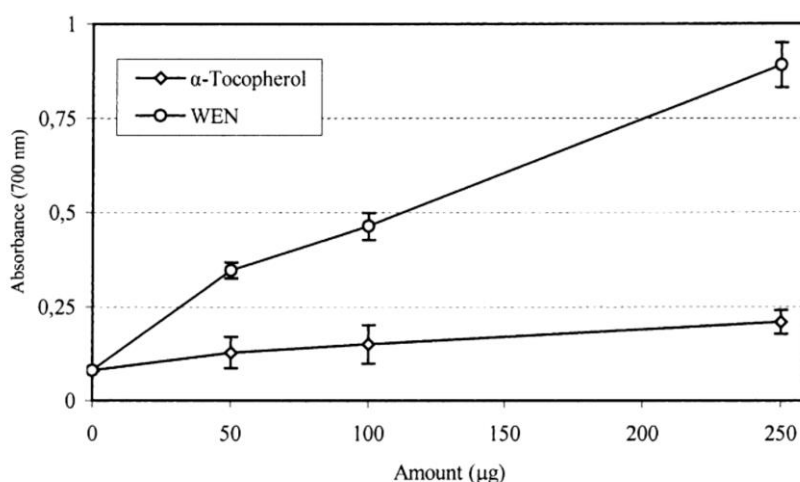
Slobodni radikali usko su povezani s patogeneza nastanka različitih bolesti poput karcinoma, dijabetesa, kardiovaskularnih, autoimunih i neurodegenerativnih bolesti. Također, sudjeluju i u procesu starenja. Antioksidansi su tvari koje hvataju i uklanjaju reaktivne kisikove i dušikove spojeve (slobodni radikali) te na taj način sprječavaju njihovo štetno djelovanje u organizmu (Ratnam i sur., 2006).

Gülçin i sur. (2004) proveli su ispitivanje djelovanja vodenog ekstrakta listova koprive na peroksidaciju linolenske kiseline primjenom tiocijanatne metode. Vodeni ekstrakt pokazao je antioksidacijsku aktivnost u svim ispitivanim koncentracijama postizući bolji učinak od referentnog α – tokoferola (Slika 10).



Slika 10. Antioksidativna aktivnost različitih koncentracija vodenog ekstrakta listova vrste *Urtica dioica* L. (WEN), α -tokoferola i linolenske kiseline (Gülçin i sur., 2004)

U istom istraživanju (Gülçin i sur., 2004) određivana je sposobnost redukcije Fe^{3+} iona vodenih ekstrakata listova koprive u usporedbi s referentnim antioksidansom α – tokoferolom. Za razliku od prije navedenih rezultata, vodeni ekstrakt lista koprive pokazao je značajno manju sposobnost redukcije Fe^{3+} iona ona od referentnog α – tokoferola (Slika 11).



Slika 11. Sposobnost redukcije Fe^{3+} iona za vodeni ekstrakt listova vrste *Urtica dioica* L. i α -tokoferol (Gülçin i sur., 2004)

Körpe i sur. (2012) istražili su antiradikalnu aktivnost metanolnih ekstrakata koprive ispitivanjem sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala, u usporedbi s butiliranim hidrositoluenom (BHT), L – askorbinskom kiselinom i α – tokoferolom kao referentnim antioksidansima. Najbolji učinak pokazao je α – tokoferol, ($IC_{50} = 5,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), L – askorbinska kiselina je djelovala nešto slabije ($IC_{50} = 5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$). Metanolni ekstrakt lista i korijena koprive također je pokazao sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, iako pri puno višim vrijednostima ($IC_{50} = 76,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, $IC_{50} = 84,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tablica 3).

Tablica 3. IC_{50} vrijednosti testiranih uzoraka određenih DPPH• metodom (Körpe i sur., 2012)

UZORAK	$IC_{50} \mu\text{g mL}^{-1} \pm SD$
List koprive	$76,3 \pm 0,00$
Korijen koprive	$84,8 \pm 0,00$
L – askorbinska kiselina	$5,9 \pm 0,30$
BHT	$12,6 \pm 0,50$
α -tokoferol	$5,3 \pm 0,50$

U opsežnom istraživanju koje su proveli Özen i Korkmaz (2003) određivan je antioksidativni učinak vodeno – etanolnog ekstrakta koprive djelujući na različite enzime koji sudjeluju u detoksikaciji organizma. Tijekom 14 dana, švicarskim albino miševima, starosti 8 – 9 tjedana, oralno su aplicirane dvije različite doze vodeno – etanolnog ekstrakta lista koprive (50 i 100 mg/kg tjelesne mase). Antioksidans butilirani hidrosianisol (BHA) služio je kao kontrola. Pripremljene su frakcije jetre, pluća i bubrega kako bi se ustvrdio učinak ekstrakta na enzime I. i II. faze metabolizma. Enzimi citokrom b5, NADH – citokrom b5 reduktaza, glutation S – transferaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, superoksid dismutaza i katalaza su pokazali znatno povećanje svoje aktivnosti primjenom obje ispitivane doze. Jedinke tretirane butiliranim hidrosianisolom (BHA) pokazale su značajan porast aktivnosti istih enzima. Miševi tretirani ekstraktom koprive su pokazali manju aktivnost enzima citokrom P450, laktat dehidrogenaze i NADPH – citokrom P450 reduktaze kao i oni tretirani butiliranim hidrosianisolom. Ekstrakt se pokazao učinkovitim pri indukciji glutation – S – transferaze, superoksid dismutaze i katalaze u plućima pri obje primijenjene doze.

2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, a u preradi hrane definira se kao prijenos jedne ili više bioloških tvari iz materijala u tekuću fazu (Lloyd i van

Wyk, 2012). Ona je osnovni korak izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala prije daljnje upotrebe ili analize. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Osim toga, prilikom odabira adekvatne metode potrebno je uzeti u obzir dostupnost tehnike ekstrakcije, čistoću ekstrakta, prinos ekstrakcije i potrošnju energije (Rostagno i Prado, 2013).

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježeg, suhog, zamrznutog, usitnjenog ili cijelog materijala. Prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva važno je uzeti u obzir njihovu topljivost te odabrati pogodno otapalo za ekstrakciju.

Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, temperaturi, vremenu ekstrakcije, polarnosti otapala te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Dai i Mumper, 2010). Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija superkritičnim fluidima su najčešće upotrebljavane tehnike izolacije fenolnih spojeva (Bimakr i sur., 2011; Ignat i sur., 2011).

Klasične (konvencionalne) metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Stoga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije, kao što su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, eng. *microwave-assisted extraction* - MAE (Putnik i sur., 2016), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, eng. *ultrasonic-assisted extractions* - UAE (Dent i sur., 2015), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, eng. *pressurized liquid extraction* - PLE (Dragović Uzelac i sur., 2015) te ekstrakcija potpomognuta plazmom, eng. *plasma assisted extractions* - PAE (Elez Garofulić i sur., 2014).

Prednosti ovih metoda su brzina, selektivnost, ekološka prihvatljivost, upotreba manjih količina otapala, veći prinos od klasične ekstrakcije te mogućnost kontrole temperature prilikom ekstrakcije.

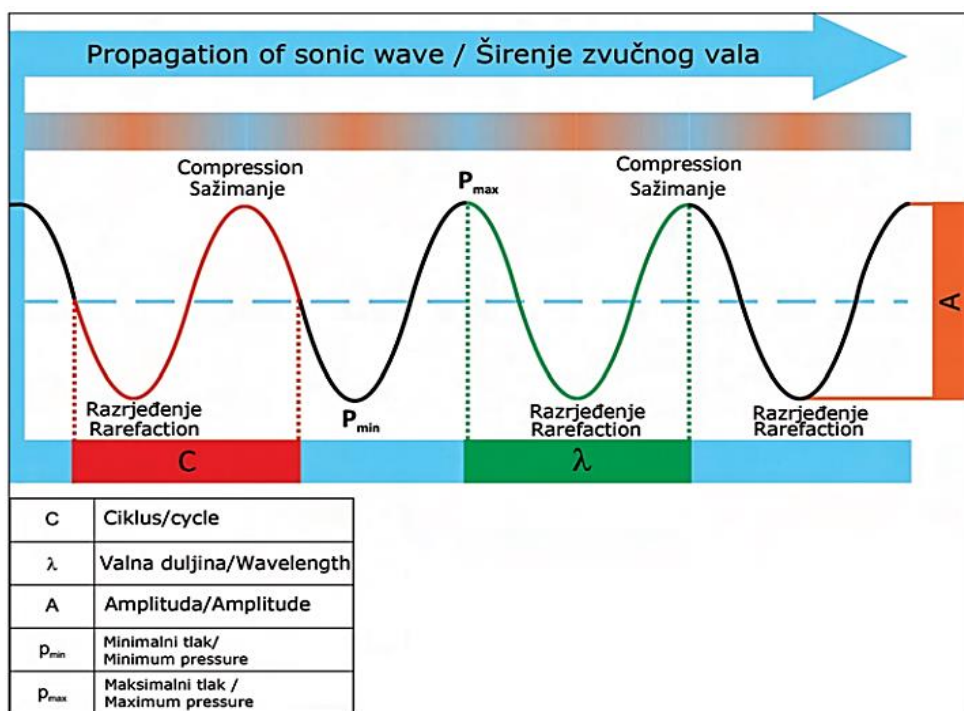
2.4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je nova, nadolazeća ekstrakcijska tehnika koja može ponuditi visoku reproducibilnost u kratkom vremenu, veće prinose bioaktivnih sastojaka, jednostavniju manipulaciju, smanjenje temperature tijekom procesa, smanjenje količine otapala i manji unos energije (Wang i Weller, 2006; Viot i sur., 2010; Klen i Vodopivec, 2012). Provodi se na uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji želimo ekstrahirati.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom često se koristi za ekstrakciju polifenola iz biljaka korištenjem etanola, mješavine etanola i vode (Albu i sur., 2004; Wang i sur., 2004; Vilku i sur., 2008; Khan i sur., 2010; Šic Žlabur i sur., 2015; Rosello Soto i sur., 2015), vode i acetona (Wang i sur., 2004) kao otapala. Ovaj tip ekstrakcije omogućava poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih sastojaka osjetljivih na temperaturu pa se proces ekstrakcije provodi pri nižim procesnim temperaturama (Vilku i sur., 2008). Osim toga, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom učinkovitija je od konvencionalne toplinske ekstrakcijske tehnike, gdje kod većine biljaka proces ekstrakcije završi unutar 15 minuta (Albu i sur., 2004).

Mehanizam ultrazvuka u tekućinama temelji se na mehaničkom efektu implozije kavitacijskih mjehurića. Tijekom implozije i pucanja kavitacijskih mjehurića dolazi do nastanka jake sile smicanja, koja uzrokuje visok tlak i temperaturu. Posljedica tih pojava je brzo razaranje biljnog tkiva i oslobađanje staničnog materijala pri čemu se poboljšava prijenos mase. Također, uslijed djelovanja ultrazvuka povećava se kinetička energija molekula čime dolazi do boljeg kontakta između ekstrakcijskog otapala i materijala. Osim mehaničkog učinka, postoji i toplinski indeks ultrazvuka koji se definira kao omjer akustičke snage proizvedene u ultrazvučnom pretvorniku i snage potrebne za zagrijavanje materijala koji se obrađuje za 1 °C (Režek Jambrak, 2008; Zinoviadou i sur., 2015).

Princip ultrazvuka temelji se na širenju zvučnih valova frekvencije veće od 20 kHz koji stvaraju mehaničke vibracije u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Zvučni valovi putuju kroz sustav (Slika 12) i izazivaju nasumične pojave ekspanzije i kompresije uslijed čega dolazi do boljeg kontakta molekula. Uslijed ekspanzije dolazi do stvaranja mjehurića u tekućem stanju te nastanka negativnog tlaka. Mjehurići rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije kod koje dolazi do bržeg prijenosa na krutu fazu unutar tekućeg medija (Luque Garcia i Luque de Castro, 2003; Brnčić i sur., 2010).



Slika 12. Širenje zvučnog vala (Bosiljkov i sur., 2010)

Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom važna je optimizacija procesa pri čemu moraju biti pravilno odabrani i uzeti u obzir sljedeći parametri: frekvencija (kHz), amplituda (%), ciklus (%), nazivna izlazna snaga (W) i geometrijski parametri sonde (dužina i promjer – mm) (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010; Dujmić i sur., 2013).

Izbor *ultrazvučne sonde* važan je za ekstrakciju bioaktivnih spojeva kod uzoraka manjih volumena (Vorobiev i Chemat, 2010). Koristeći sonde različitih promjera može se provesti ekstrakcija do čak 100 puta veće jačine od onih u ultrazvučnoj kupelji. Jedna od glavnih značajki za uspješnu primjenu ultrazvučnih sondi je činjenica da se ultrazvučna energija ne prenosi kroz tekući medij za ekstrakciju već je uvedena izravno u sustav (Bendicho i Lavilla, 2000). U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom koristile su se sonde promjera 7 mm i 22 mm. Rezultati prinosa ukupnih fenola veći su kod sonde promjera 22 mm (77,89 mg/g uzorka), nego kod sonde promjera 7 mm (59,43 mg/g uzorka). Iz toga možemo zaključiti da je prinos ekstrakcije proporcionalno ovisan o promjeru sonde, međutim prilikom odabira promjera sonde važno je imati na umu samu izvedbu uređaja jer sonda većeg promjera daje veću ultrazvučnu energiju, a time i brže zagrijavanje medija i njegovo prskanje u okolinu čime dolazi do gubitaka.

Na provedbu ekstrakcije utjecaj ima i *vrijeme sonikacije*. Pri istom vremenu ekstrakcije veći prinos fenolnih spojeva dobije se ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom s direktno

uronjenom sondom nego ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji. U istraživanju Dent i sur. (2015) vrijeme ekstrakcije (8, 10, 11 i 12 minuta) od 11 minuta pokazalo se optimalnim za prinos fenolnih spojeva u usporedbi s ostalim vremenima. U ovom istraživanju pokazano je da je kraće vrijeme sonikacije nedostavno za ultrazvučno razaranje stijenki stanica i otpuštanje fenolnih spojeva iz staničnih dijelova. Produljenjem vremena iznad 11 minuta, prinos fenolnih spojeva nije se znatno povećavao. Autori Šic Žlabur i sur. (2015), Ince i sur. (2014), Chemat i sur. (2004) te Rostango i sur. (2003) pokazali su da vrijeme sonikacije ima značajan utjecaj na prinos ekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva. Dužim vremenom ekstrakcije povećavao se prinos fenolnih spojeva. U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) na ekstraktu stevije optimalno vrijeme ekstrakcije bilo je 10 minuta, dok su vremena od 2, 4, 6 i 8 minuta bila prekratka i rezultirala su manjim prinosima ukupnih fenolnih spojeva.

Povećanje *razine jakosti* ultrazvuka doprinosi bržem i jačem učinku koji smanjuje vanjski otpor i povećava prijenos mase, tako da povećanje jakosti ultrazvuka povećava učinkovitost miješanja. Utjecaj jakosti ultrazvuka na prinos fenolnih spojeva analizirao se i u istraživanju Dent i sur. (2015). Rezultati pokazuju da u ekstraktima dobivenim korištenjem ultrazvuka jakosti 400 W količine identificiranih polifenola su veće nego korištenjem ultrazvuka jakosti 100 W. U istraživanju Ince i sur. (2014) provedenom na koprivi uspoređeni su rezultati dobiveni uporabom ultrazvuka jakosti 150 W i 240 W, gdje je dokazano da je pri jakosti od 240 W bio veći prinos fenolnih spojeva.

Otapalo koje se koristi za izvođenje tretmana s ultrazvukom treba biti pažljivo izabrano. Kao opće pravilo, većina aplikacija se izvodi u vodi. Međutim, ovisno o namjeni, mogu se upotrijebiti i ostale manje polarne tekućine kao što su neke organske. I viskoznost otapala i površinska napetost utječu na inhibiciju kavitacije. Ako postoje veće prirodne kohezivne sile koji djeluje u tekućini (na primjer, visoka viskoznost i visoka površinska napetost) teže je postići kavitaciju (Mason, 1992). Odabir prikladnog otapala znatno utječe na prinos fenolnih spojeva. Najčešća otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva su alkoholi (etanol, metanol), voda i aceton. U radu Dent i sur. (2015) ultrazvučna ekstrakcija provedena je pod ultrazvučnim radnim parametrima (100 % amplituda/radni ciklus, ultrazvučni uređaj od 400 W), uz upotrebu 30%-tnih vodenih otopina etanola i acetona, vode te vremenom sonikacije od 11 minuta. Prema rezultatima najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenola i flavonoida je: etanol (30 %) > aceton (30 %) > voda. U istraživanju Proestos i sur. (2006) kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva pokazala se 60 %-tna vodena otopina metanola, dok su primjenom 60 % - tne vodene otopine acetona, vode i etil acetat/voda (60:30, v/v) dobiveni niži prinosi.

Intenzitet prozvučivanja proporcionalan je *amplitudi* vibracija ultrazvučnog izvora i kao takav, prirast amplitude vibracija će dovesti do povećanja intenziteta vibracija i povećanja sonikacijskog učinka. Da bi se postigao prag kavitacije potreban je minimalni intenzitet. To znači da veće amplitude nisu uvijek potrebne da se dobiju željeni rezultati. Osim toga, visoke amplitude ultrazvuka mogu dovesti do oštećenja ultrazvučne sonde, što može rezultirati u tekućem mediju agitaciju umjesto kavitacije i loš prijenos ultrazvuka kroz tekući medij. Međutim, amplituda ultrazvuka trebala bi biti veća kada se radi s uzorcima visoke viskoznosti. Također povećana amplituda ultrazvuka potrebna je za dobivanje mehaničkih vibracija koje potiču kavitaciju (Santos i sur., 2008). Hossain i sur. (2012) proveli su istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz aromatskih biljka porodice Lamiaceae pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: ultrazvučnog procesora jakosti 1500 W, promjera sonde 19 mm u trajanju 5 do 15 min s 80 % vodenom otopinom metanola te variranom amplitudom (24 – 61 μm). Utvrdili su da na izolaciju fenolnih spojeva značajan utjecaj ima amplituda ultrazvuka te da porastom amplitude značajno raste prinos fenolnih spojeva.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje ovog istraživanja korišten je uzorak liofiliziranih listova koprive (*Urtica dioica* L.) (Slika 13) ubranih na području Žumberka u mjestu Sela Žakanjska tijekom proljeća 2019. godine.



Slika 13. Liofilizirani listovi koprive (*Urtica dioica* L.) (vlastita fotografija, 2019)

Uzorci su dopremljeni u svježem obliku te pohranjeni u hladnjak pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja postupka liofilizacije (trajanje liofilizacije: 24h na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nakon postupka liofilizacije i neposredno prije provedbe eksperimenta, listovi koprive usitnjeni su pomoću tarionika s tučkom (Slika 14).



Slika 14. Usitnjeni liofilizirani listovi koprive (vlastita fotografija, 2019)

3.2. METODE RADA

Izolacija fenolnih spojeva iz prethodno liofiliziranih listova koprive provedena je primjenom ekstrakcije pomoću ultrazvuka (UAE ekstrakcija) uz upotrebu 96 % - tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Prema planu pokusa punog faktorskog dizajna, ekstrakcija je provedena pri različitim amplitudama ultrazvuka i vremenu trajanja tretmana ultrazvukom. U dobivenim ekstraktima lista koprive spektrofotometrijski su određeni ukupni fenolni spojevi i pigmenti (klorofili *a* i *b* te karotenoidi).

3.2.1. PRIPREMA UZORKA

Svježi uzorak lista koprive prethodno je zamrznut na temperaturu od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i potom podvrgnut postupku liofilizacije na liofilizatoru Martin Christ Alpha 1 – 4 LSC plus. Na pet plitica u jednom sloju raspoređena je masa od oko 500 g zamrznutog lista koprive nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je ukupno trajao 24 sata. Dio osušenih listova koprive usitnjen je u tarioniku do konzistencije praha te kao takav korišten je za daljnju analizu. Ostatak uzorka pakiran je u hermetički zatvorene polipropilenske vrećice i skladišten pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka provođenja analize.

3.2.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (UAE)

Za provedbu ekstrakcijskog postupka potpomognutog ultrazvukom korišten je uređaj tvrtke Dr. Hielscher GMBH (Teltow, Njemačka) UP200Ht konstantne frekvencije od 26 kHz. Koristila se sonda promjera 2 mm.

Nakon toga dobiveni ekstrakti su filtrirani pomoću filter papira. Uzorci su označeni od Uz-1 do Uz-24 i čuvani do analize pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Laboratorijski ultrazvuk Dr. Hielscher Ultrasonic Processor UP200Ht
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL
- Filter papir
- Erlenmeyerova tikvica, volumena 50 ml

- Kapaljka
- Stakleni lijevci
- Lončić metalni
- Staklene čaše, volumena 50 ml
- Plastične kivete, volumena 50 ml
- Laserski uređaj za mjerenje temperature

Reagensi:

- 96 %-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Destilirana voda

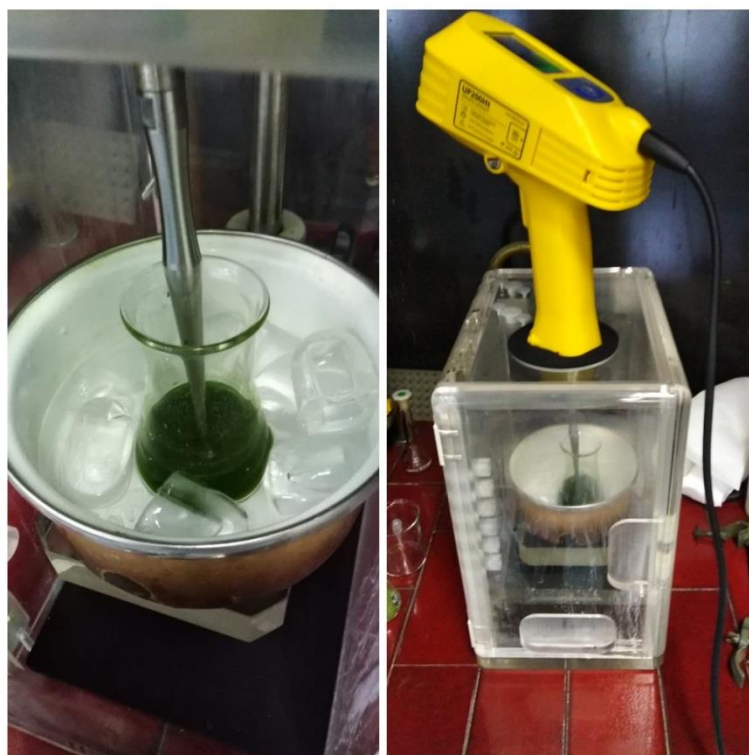
Postupak ekstrakcije:

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je prema dizajnu eksperimenta prikazanog u Tablici 4.

Tablica 4. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom UAE

ID	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Temperatura (°C)	m uzorka (g)
1	5	25	16	1,0007
2	10	25	17	1,0002
3	15	25	16	1,0075
4	20	25	15	1,0023
5	30	25	11	1,0162
6	40	25	14	1,0175
7	5	50	16	1,0103
8	10	50	11	1,0065
9	15	50	9	1,0386
10	20	50	9	1,0118
11	30	50	15	1,0094
12	40	50	11	1,0014
13	5	75	19	1,0180
14	10	75	20	1,0041
15	15	75	18	1,0078
16	20	75	21	1,0173
17	30	75	20	1,0076
18	40	75	17	1,0509
19	5	100	26	1,0201
20	10	100	21	1,0068
21	15	100	27	1,0039
22	20	100	24	1,0069
23	30	100	23	1,0197
24	40	100	20	1,0270

Na analitičkoj vagi u Erlenmeyerovoj tikvici od 50 ml odvažuje se približno 1 g uzorka praha liofiliziranih listova koprive te se doda 40 mL 96 % - tnog etanola. Erlenmeyerova tikvica sa smjesom uzorka i ekstrakcijskog otapala pažljivo se stavi u metalni lončić ispunjen ledom (u svrhu održavanja niske temperature). Stalak s lončićem i tikvicom podigne se do razine ultrazvučne sonde uronjene do sredine volumena uzorka pritom pazeći da sonda ne dodiruje rubove tikvice, tj. da je u centriranom položaju (Slika 15). Kućište uređaja od pleksiglasa se pažljivo zatvori.



Slika 15. Laboratorijski ultrazvuk Dr. Hielscher Ultrasonic Processor UP200Ht (vlastita fotografija, 2019)

Prije početka same ekstrakcije, uređaj se podese prema zadanim parametrima (amplituda, vrijeme ekstrakcije). Za vrijeme i po završetku ekstrakcije, temperatura uzorka se očitava laserskim uređajem za mjerenje temperature. Po potrebi dodaje se led te kontrolira položaj sonde. Također, potrebno je spriječiti gubitak uzorka prskanjem koje nastaje kao posljedica kavitacije.

Po završetku ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se filtriraju pomoću filter papira u odmjerne tikvice od 50 mL i nadopune do oznake ekstrakcijskim otapalom. Ekstrakti se potom prenesu

u plastične kivete volumena 50 ml te skladište u hladnjaku pri temperaturi od – 20 °C sve do provođenja spektrofotometrijskih analiza.

3.2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Princip određivanja:

Princip metode se temelji na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin – Ciocalteu reagensom nastaje plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer) i staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična ladica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Kupelj rotavapora (BÜCHI HeatingBath B-490, Švicarska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Staklene čaše, volumena 50 mL

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Destilirana voda
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20% - tna)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni.

Postupak određivanja:

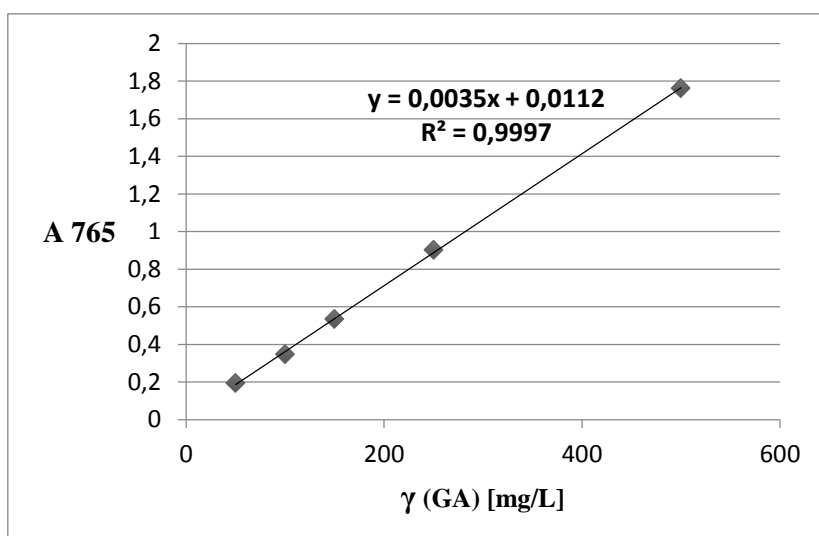
U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se kratko promiješa pomoću Vortex uređaja, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C (u kupelji rotavapora). Slijepa proba se pripremi na isti način kao i uzorak, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneju tikvici volumena 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac (Slika 16) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Dobivene koncentracije ukupnih fenola (mg GAE L^{-1}) preračunavaju se u masene udjele (mg GAE g^{-1} s.t.), a rezultat se izražava kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija.



γ (GA) [mg/L]	A 765 nm
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

Slika 16. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

$$R^2 = 0,9997$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

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

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KLOROFILA A, KLOROFILA B I UKUPNIH KAROTENOIDA

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu je apsorpcijski maksimum za klorofil *a* (Ch-*a*) u plavom (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm), dok se apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* (Ch-*b*) nalaze između dvaju maksimuma klorofila *a* (Ch-*a*) i to na oko 450 i 640 nm (Abou – Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2015).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklena čaša, volumena 50 mL

Reagensi:

- 96 % -tni etanol

Postupak određivanja:

Dobivene ekstrakte lista koprive za kvantitativno određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida je potrebno prethodno razrijediti s 96 %-tnim etanolom te se potom mjeri apsorbancija na 470 nm, 649 nm i 664 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto uzorka uzima 96 %-tni etanol. Svako mjerenje provedeno je u paraleli. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Razrijeđenja:

Uzorci pod brojevima 1 – 4 razrijeđeni su 5 puta: na 1 mL ekstrakta dodano je 4 mL 96 %-tnog etanola. Uzorci pod brojevima 5 – 12 razrijeđeni su 10 puta: na 300 µL ekstrakta dodano je 2700 µL 96 %-tnog etanola. Uzorci pod brojevima 13 – 16 razrijeđeni su 15 puta: na 200 µL ekstrakta dodano je 2800 µL 96 %-tnog etanola.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema slijedećim jednadžbama (Sumanta i sur., 2014):

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [2]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,63 C_b) / 209 \quad [3]$$

gdje su:

A = apsorbancija

C_a = klorofil *a*

C_b = klorofil *b*

$C_{(x+c)}$ = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija (mg L^{-1}) potom su preračunate i izražene kao mg g^{-1} suhe tvari (mg g^{-1} s.t.) \pm standardna devijacija.

3.2.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Eksperimentalni dizajn (Tablica 4) te statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: koncentracije ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u mg g^{-1} suhe tvari te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: amplitude ultrazvuka (25, 50, 75 i 100 %) i vremena ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta). Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multivarijantne analize varijance (MANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

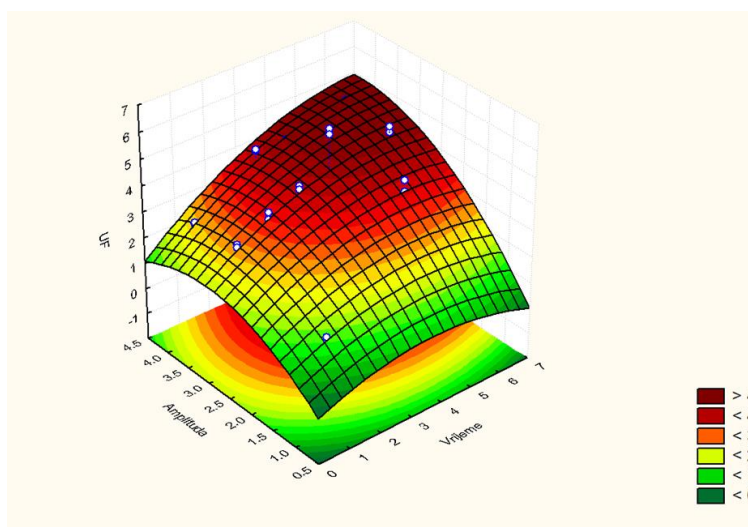
U ovom radu istraživana je utjecaj amplitude ultrazvuka (25, 50, 75 i 100 %) i vremena ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta) na maseni udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* te karotenoida iz lista koprive (*Urtica dioica* L.) ekstrahirana primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja i prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Koncentracije ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* te karotenoida iz lista koprive (*Urtica dioica* L.) ovisno o amplitudi ultrazvuka i vremenu ekstrakcije

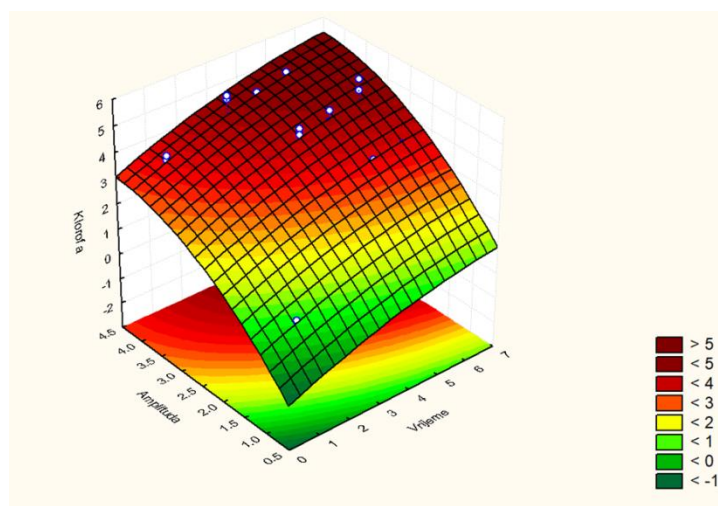
ID	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Ukupni fenoli (mg g ⁻¹ suhe tvari)	Klorofil <i>a</i> (mg g ⁻¹ suhe tvari)	Klorofil <i>b</i> (mg g ⁻¹ suhe tvari)	Karotenoidi (mg g ⁻¹ suhe tvari)
1	5	25	1,63 ± 0,05	0,88 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,02
2	10	25	1,64 ± 0,13	0,85 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,02
3	15	25	1,77 ± 0,02	0,96 ± 0,07	0,33 ± 0,09	0,26 ± 0,00
4	20	25	1,65 ± 0,13	0,94 ± 0,21	0,31 ± 0,04	0,25 ± 0,02
5	30	25	1,64 ± 0,06	1,53 ± 0,08	0,56 ± 0,03	0,37 ± 0,02
6	40	25	1,31 ± 0,07	1,46 ± 0,05	0,54 ± 0,07	0,37 ± 0,01
7	5	50	1,60 ± 0,10	1,85 ± 0,12	0,66 ± 0,09	0,59 ± 0,02
8	10	50	1,71 ± 0,03	2,05 ± 0,15	0,71 ± 0,01	0,65 ± 0,06
9	15	50	2,35 ± 0,00	2,22 ± 0,12	0,83 ± 0,04	0,68 ± 0,03
10	20	50	2,71 ± 0,10	3,24 ± 0,05	1,15 ± 0,03	0,92 ± 0,03
11	30	50	4,12 ± 0,32	3,71 ± 0,21	1,32 ± 0,04	1,04 ± 0,07
12	40	50	3,34 ± 0,10	3,92 ± 0,07	1,49 ± 0,03	1,03 ± 0,04
13	5	75	2,81 ± 0,08	2,20 ± 0,01	0,78 ± 0,06	0,71 ± 0,01
14	10	75	3,44 ± 0,20	2,96 ± 0,21	1,04 ± 0,03	0,92 ± 0,08
15	15	75	4,00 ± 0,11	2,93 ± 0,10	1,10 ± 0,04	0,91 ± 0,03
16	20	75	5,63 ± 0,14	4,36 ± 0,17	1,55 ± 0,09	1,29 ± 0,03
17	30	75	3,53 ± 0,22	4,51 ± 0,27	1,19 ± 0,59	1,28 ± 0,07
18	40	75	4,75 ± 0,15	5,24 ± 0,30	1,79 ± 0,38	1,44 ± 0,05
19	5	100	2,58 ± 0,40	3,80 ± 0,11	1,37 ± 0,04	1,07 ± 0,06
20	10	100	2,53 ± 0,17	3,87 ± 0,12	1,47 ± 0,04	1,06 ± 0,05
21	15	100	4,40 ± 0,04	5,16 ± 0,10	1,93 ± 0,01	1,39 ± 0,03
22	20	100	4,31 ± 0,02	4,78 ± 0,14	1,74 ± 0,14	1,35 ± 0,00
23	30	100	3,87 ± 0,27	5,02 ± 0,27	1,84 ± 0,16	1,32 ± 0,05
24	40	100	4,76 ± 0,17	3,92 ± 0,09	1,46 ± 0,02	1,07 ± 0,02

Da bi se utvrdio utjecaj amplitude ultrazvuka i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u listu koprive s ciljem optimiranja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine.

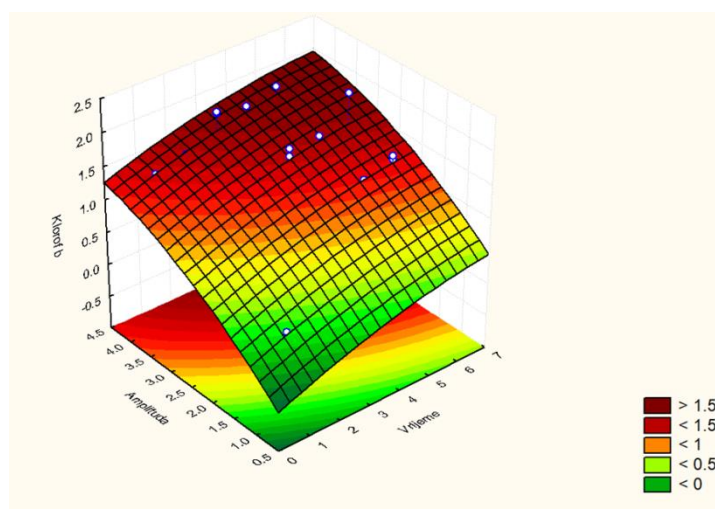
Na Slikama 17 – 20 prikazan je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktu lista koprive u ovisnosti o amplitudi i vremenu ekstrakcije.



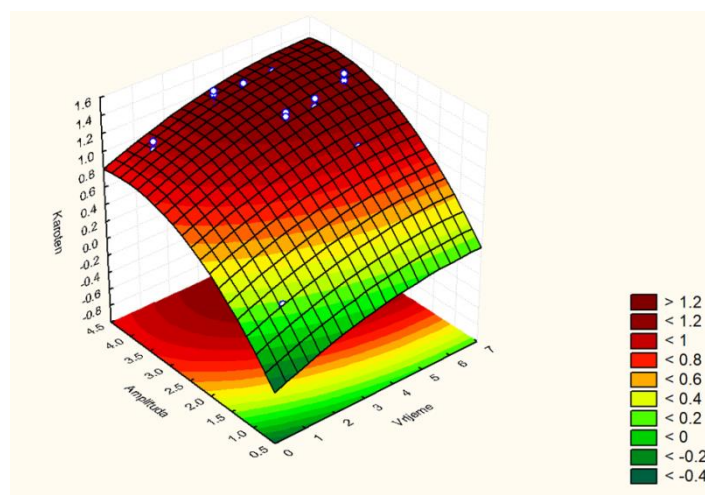
Slika 17. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu lista koprive u ovisnosti o amplitudi i vremenu ekstrakcije



Slika 18. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio klorofila a u ekstraktu lista koprive u ovisnosti o amplitudi i vremenu ekstrakcije



Slika 19. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio klorofila b u ekstraktu lista koprive u ovisnosti o amplitudi i vremenu ekstrakcije



Slika 20. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio karotenoida u ekstraktu lista koprive u ovisnosti o amplitudi i vremenu ekstrakcije

Iz trodimenzionalnog prikaza odzivnih površina vidljivo je da amplituda ima signifikantan utjecaj na maseni udio ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida odnosno povećanje vremena ekstrakcije rezultira povećanjem masenog udjela svih analiziranih spojeva.

U Tablici 6 prikazane su jednadžbe regresijskog modela i pripadajući koeficijenti determinacije.

Tablica 6. Jednadžba regresijskog modela i koeficijent determinacije za koncentraciju ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima lista koprive

Varijabla (Y)	Model	R ²
Ukupni fenoli	$Y = 3,62 + 1,47X_1 - 0,88X_1^2 + 2,34X_2 - 1,48X_2^2 + 0,97X_1X_2$	0,76
Klorofil <i>a</i>	$Y = 3,41 + 1,65X_1 - 0,36X_1^2 + 3,25X_2 - 1,13X_2^2 + 0,03X_1X_2$	0,88
Klorofil <i>b</i>	$Y = 1,18 + 0,55X_1 - 0,13X_1^2 + 1,18X_2 - 0,27X_2^2 - 0,05X_1X_2$	0,83
Karotenoidi	$Y = 1,01 + 0,38X_1 - 0,14X_1^2 + 0,91X_2 - 0,47X_2^2 + 0,01X_1X_2$	0,90

X₁-vrijeme; X₂-amplituda

Jednadžba regresijskog modela omogućava predviđanje koncentracije ukupnih fenola klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida za svaku vrijednost amplitude i vremena ekstrakcije. Pripadajući koeficijenti determinacije (R²) pokazuju kolika je preciznost modela za predviđanje ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida. Izračunate vrijednosti koeficijenta determinacije ukazuju na dobro prilagođen model od čega je najbolji za karotenoide (0,90).

4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE

Rezultati statističke analize pojedinačnih i kombiniranih utjecaja vremena ekstrakcije i amplitude UZV na masene udjele ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima lista koprive prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Utjecaj vremena ekstrakcije i amplitude UZV na masene udjele ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima lista koprive (*Urtica dioica* L.)

		N	UF mg g ⁻¹ s.t.	Ch – <i>a</i> mg g ⁻¹ s.t.	Ch – <i>b</i> mg g ⁻¹ s.t.	Karotenoidi mg g ⁻¹ s.t.
Vrijeme (min)			p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†
5		8	2,15±0,05 ^a	2,18±0,05 ^b	0,78±0,05 ^c	0,65±0,01 ^b
10		8	2,33±0,05 ^a	2,43±0,05 ^c	0,89±0,05 ^{c,d}	0,71±0,01 ^b
15		8	3,13±0,05 ^b	2,89±0,05 ^d	1,04±0,05 ^{a,d}	0,81±0,01 ^c
20		8	3,57±0,05 ^c	3,33±0,05 ^e	1,19±0,05 ^{a,b}	0,95±0,01 ^a
30		8	3,29±0,05 ^b	3,69±0,05 ^a	1,22±0,05 ^{a,b}	1,00±0,01 ^a
40		8	3,54±0,05 ^c	3,63±0,05 ^a	1,32±0,05 ^b	0,97±0,01 ^a
Amplituda (%)			p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†
25		12	1,61±0,04 ^a	1,10±0,04 ^a	0,39±0,05 ^a	0,28±0,01 ^a
50		12	2,64±0,04 ^b	2,83±0,04 ^b	1,02±0,05 ^b	0,82±0,01 ^b
75		12	4,03±0,04 ^d	3,70±0,04 ^c	1,24±0,05 ^c	1,09±0,01 ^c
100		12	3,74±0,04 ^c	4,43±0,04 ^d	1,64±0,05 ^d	1,21±0,01 ^d
Vrijeme (min)	Amplituda (%)		p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†	p ≤ 0,05†
5	25	2	1,63±0,10 ^a	0,88±0,10 ^{a,b}	0,30±0,11 ^a	0,24±0,03 ^a
5	50	2	1,60±0,10 ^a	1,85±0,10 ^{d,e}	0,66±0,11 ^{a,b,c}	0,59±0,03 ^b
5	75	2	2,81±0,10 ^{b,c}	2,20±0,10 ^e	0,78±0,11 ^{a,b,c,d,e}	0,71±0,03 ^b
5	100	2	2,58±0,10 ^b	3,80±0,10 ^{g,h,i}	1,37±0,11 ^{f,g,h,i}	1,07±0,03 ^c
10	25	2	1,64±0,10 ^a	0,85±0,10 ^a	0,32±0,11 ^a	0,22±0,03 ^a
10	50	2	1,71±0,10 ^a	2,05±0,10 ^{d,e}	0,71±0,11 ^{a,b,c,d}	0,65±0,03 ^b
10	75	2	3,44±0,10 ^{d,e}	2,96±0,10 ^f	1,04±0,11 ^{b,c,d,e,f,g}	0,92±0,03 ^c
10	100	2	2,53±0,10 ^b	3,87±0,10 ^{h,i}	1,47±0,11 ^{g,h,i}	1,06±0,03 ^c
15	25	2	1,77±0,10 ^a	0,96±0,10 ^{a,b,c}	0,33±0,11 ^a	0,26±0,03 ^a
15	50	2	2,35±0,10 ^b	2,22±0,10 ^e	0,83±0,11 ^{a,b,c,d,e,f}	0,68±0,03 ^b
15	75	2	4,00±0,10 ^{e,f}	2,93±0,10 ^f	1,10±0,11 ^{b,c,d,e,f,g}	0,91±0,03 ^c
15	100	2	4,40±0,10 ^{f,g}	5,17±0,10 ^m	1,94±0,11 ⁱ	1,39±0,03 ^d
20	25	2	1,65±0,10 ^a	0,94±0,10 ^{a,b,c}	0,31±0,11 ^a	0,25±0,03 ^a
20	50	2	2,71±0,10 ^b	3,24±0,10 ^{f,g}	1,15±0,11 ^{b,c,d,e,f,g,h}	0,92±0,03 ^c
20	75	2	5,63±0,10 ^h	4,36±0,10 ^{i,j,k}	1,55±0,11 ^{h,i}	1,29±0,03 ^d
20	100	2	4,31±0,10 ^{f,g}	4,78±0,10 ^{k,l,m}	1,74±0,11 ^{h,i}	1,35±0,03 ^d
30	25	2	1,64±0,10 ^a	1,53±0,10 ^{c,d}	0,56±0,11 ^{a,b,c}	0,37±0,03 ^a
30	50	2	4,12±0,10 ^f	3,71±0,10 ^{g,h}	1,32±0,11 ^{d,e,f,g,h,i}	1,04±0,03 ^c
30	75	2	3,53±0,10 ^{d,e}	4,51±0,10 ^{j,k,l}	1,19±0,11 ^{c,d,e,f,g,h,i}	1,28±0,03 ^d
30	100	2	3,87±0,10 ^{d,e,f}	5,02±0,10 ^{l,m}	1,84±0,11 ⁱ	1,32±0,03 ^d
40	25	2	1,31±0,10 ^a	1,46±0,10 ^{b,c,d}	0,54±0,11 ^{a,b}	0,37±0,03 ^a
40	50	2	3,34±0,10 ^{c,d}	3,92±0,10 ^{h,i,j}	1,49±0,11 ^{g,h,i}	1,03±0,03 ^c
40	75	2	4,76±0,10 ^g	5,24±0,10 ^m	1,79±0,11 ^{h,i}	1,44±0,03 ^d
40	100	2	4,76±0,10 ^g	3,92±0,10 ^{h,i,j}	1,46±0,11 ^{f,g,h,i}	1,07±0,03 ^c
Prosječna vrijednost		48	3,00±0,18	3,02±0,21	1,07±0,08	0,85±0,06

Bilješka. Vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,05$.

*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u mg g⁻¹ s.t.

† Statistički značajni parametar kod $p \leq 0,05$.

4.1.1. UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE

Prema rezultatima multivarijantne analize varijance (MANOVA) vrijeme ekstrakcije je statistički značajno utjecalo na koncentraciju svih promatranih spojeva. Koncentracija ukupnih fenola je bila najviša kod vremena ekstrakcije od 20 minuta te opada s produljenjem vremena, dok su najviše koncentracije klorofila *a* i karotenoida određene pri vremenu ekstrakcije od 30 minuta. Najviša koncentracija klorofila *b* određena je kod ekstrakcijskog vremena od 40 minuta.

U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) provedenom na ekstraktu stevije dužim vremenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom povećavao se prinos fenolnih spojeva te je optimalno vrijeme ekstrakcije bilo 10 minuta, dok su vremena od 2, 4, 6 i 8 minuta bila prekratka i rezultirala su manjim prinosima ukupnih fenola što nije bio slučaj u ovome istraživanju. Slično ovom istraživanju, Veličković i sur. (2006) su ustanovili da je optimalno vrijeme ekstrakcije fenolnih spojeva kod ljekovite i ljepljive kadulje 20 minuta u odnosu na vremena od 5, 10, 40 i 80 minuta. Autori Carrea i sur. (2012) proveli su istraživanje na ekstraktima grožđa i utvrdili da vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj na koncentraciju fenolnih spojeva. Kraće vrijeme sonikacije ponekad nije dovoljno da bi ultrazvuk razorio stijenke stanica i da bi došlo do otpuštanja polifenolnih spojeva iz staničnih dijelova, ali produljenjem vremena tretiranja može doći do degradacije fenolnih spojeva i negativnog utjecaja.

Kong i sur. (2012) određivali su optimalne uvjete ekstrakcije ukupnih klorofila kod mikroalge *Chlorella vulgaris* pri vremenima 30, 60 i 90 minuta i ustanovili da je optimalno više vrijeme ekstrakcije od 79 minuta, dok su u ovom istraživanju određena optimalna vremena ekstrakcije od 30 minuta za klorofil *a*, odnosno 40 minuta za klorofil *b*. Autori Li i sur. (2013) proučavali su ekstrakciju ultrazvukom karotenoida iz mrkve pri vremenima od 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minuta te utvrdili da je optimalno vrijeme ekstrakcije 20 minuta. Optimizaciju ekstrakcije karotenoida iz annatto sjemenki određivali su Yolmeh i sur. (2014) i odredili da je optimalno vrijeme ekstrakcije ultrazvukom 7,25 minuta, a eksperimentalna vremena bila su: 2, 4, 6, 8 i 10 minuta.

4.1.2. UTJECAJ AMPLITUDE ULTRAZVUKA

Statistička analiza je pokazala da koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida raste proporcionalno porastom amplitude UZV dok je najviša koncentracija ukupnih fenola određena pri amplitudi UZV od 75 %.

Utjecaj amplitude (20, 50 i 100 %) na ekstrakciju fenolnih spojeva istraživao je u radu Carrea i sur. (2012). Najveći prinos fenolnih spojeva bio je pri višoj amplitudi od 100 %, ali nije bilo značajne razlike između 100 % -tne i 50 % -tne amplitude, dok su korištenjem niže amplitude od 20 % dobiveni rezultati masenog udjela fenolnih spojeva značajno manji. Također, korištenjem 100 % amplitude postigli su se najbolji rezultati ekstrakcije u istraživanju Dent i sur. (2015), no u tom istraživanju vrijednost amplitude je konstantna.

Kraće vrijeme sonikacije ponekad nije dovoljno da bi ultrazvuk razorio stijenke stanica i da bi došlo do otpuštanja polifenolnih spojeva iz staničnih dijelova, ali produljenjem vremena tretiranja može doći do degradacije fenolnih spojeva i negativnog utjecaja.

Za razliku od ovog istraživanja, autori Jaeschke i sur. (2017) utvrdili su da je najviša koncentracija karotenoida pri nižoj amplitudi (50 %), a najmanja pri najvišoj (100 %). Navode da je razlog tome nastajanje slobodnih vodikovih i hidroksidnih radikala za vrijeme kavitacije koji reagiraju s karotenoidima uzrokujući njihovu degradaciju.

Pregledom literature ustanovljeno je da istraživanja koja se bave utjecajem amplitude ultrazvuka na ekstrakciju klorofila *a* i *b* do sada nisu objavljena te ih nije moguće usporediti s rezultatima ovog istraživanja.

4.1.3. KOMBINIRANI UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE I AMPLITUDE ULTRAZVUKA

Kod kombiniranog utjecaja vremena ekstrakcije i amplitude UZV, MANOVA je pokazala da je koncentracija ukupnih fenola bila najviša pri vremenu ekstrakcije od 20 minuta i amplitudi UZV 75 % koja se pokazala najboljom i za ekstrakciju klorofila *a* i karotenoida, ali tijekom 40 minuta. Najbolji uvjeti ekstrakcije klorofila *b* iz lista koprive bili su: vrijeme ekstrakcije od 15 minuta i amplituda UZV 100 %.

Hossain i sur. (2012) proveli su istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz aromatskih biljka porodice Lamiaceae pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: ultrazvučnog procesora jakosti 1500 W, promjera sonde 19 mm u trajanju 5, 10 i 15 min s 80 % -tnom

vodenom otopinom metanola te varijacijama u amplitudi (24 – 61 μm). Utvrdili su da na izolaciju fenolnih spojeva značajan utjecaj ima amplituda ultrazvuka te da porastom amplitude značajno raste prinos fenolnih spojeva. Optimalno vrijeme ekstrakcije bilo je 10 minuta.

Također, u istraživanju Yolmeh i sur. (2014) određeno je optimalno vrijeme ekstrakcije ultrazvukom 7,25 minuta (eksperimentalna vremena bila su: 2, 4, 6, 8 i 10 minuta) pri najvećem intenzitetu zračenja od $22,5 \text{ W m}^{-2}$.

Tablica 8. Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida iz lista koprije (*Urtica dioica* L.) primjenom UZV te njihove predviđene i eksperimentalne vrijednosti

	Vrijeme (min)	Amplituda (%)	Predviđene vrijednosti (mg g^{-1} s.t.)	Eksperimentalne vrijednosti (mg g^{-1} s.t.)
Ukupni fenoli	40	75	4,38	4,05
Klorofil <i>a</i>	40	100	5,13	3,98
Klorofil <i>b</i>	30	75	1,49	1,28
Karotenoidi	30	75	1,23	1,19

Prema statističkim podacima, kao što je vidljivo u Tablici 8, optimalni uvjeti za UZV ekstrakciju ukupnih fenola su vrijeme ekstrakcije od 40 minuta i amplituda UZV od 75 % uz prinos ekstrakcije $4,05 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. Isto vrijeme je optimalno i za ekstrakciju klorofila *a*, ali pri amplitudi UZV 100% s prinosom $3,98 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. Za ekstrakciju klorofila *b* i karotenoida optimalno vrijeme je 30 minuta te amplituda UZV 75 %. Dobiveni ekstrakcijski prinos za klorofil *b* je $1,28 \text{ mg g}^{-1}$ s.t., a za karotenoide iznosi $1,19 \text{ mg g}^{-1}$ s.t.

Navedeni optimalni uvjeti pokazuju da je za ekstrakciju ukupnih fenola i klorofila *a* bolje primijeniti dužu ekstrakciju pri višim amplitudama, dok je za ekstrakciju klorofila *b* i karotenoida bolje provesti kraću ekstrakciju pri nešto nižim amplitudama UZV.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u okviru ovog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Prema rezultatima multivarijantne analize varijance (MANOVA) vrijeme ekstrakcije je statistički značajno utjecalo na koncentraciju svih promatranih spojeva.
2. Koncentracija ukupnih fenola je bila najviša pri vremenu ekstrakcije od 20 minuta te opada s produljenjem vremena, dok su najviše koncentracije klorofila *a* i karotenoida određene pri vremenu ekstrakcije od 30 minuta. Najviša koncentracija klorofila *b* određena je kod ekstrakcijskog vremena od 40 minuta.
3. Statistička analiza je pokazala da koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida raste proporcionalno porastom amplitude UZV dok je najviša koncentracija ukupnih fenola određena pri amplitudi UZV od 75 %.
4. Kod kombiniranog utjecaja vremena ekstrakcije i amplitude UZV, MANOVA je pokazala da je koncentracija ukupnih fenola bila najviša pri vremenu ekstrakcije od 20 minuta i amplitudi UZV 75 % koja se pokazala najboljom i za ekstrakciju klorofila *a* i karotenoida, ali tijekom 40 minuta. Najbolji uvjeti za ekstrakciju klorofila *b* iz lista koprive bili su: vrijeme ekstrakcije od 15 minuta i amplituda UZV 100 %.
5. Prema statističkim podacima, optimalni uvjeti za UZV ekstrakciju ukupnih fenola su vrijeme ekstrakcije od 40 minuta i amplituda UZV od 75 % uz prinos ekstrakcije 4,05 mg g⁻¹ s.t. Isto vrijeme je optimalno i za ekstrakciju klorofila *a*, ali pri amplitudi UZV 100 % s prinosom 3,98 mg g⁻¹ s.t. Za ekstrakciju klorofila *b* i karotenoida optimalno vrijeme je 30 minuta te amplituda UZV 75 %. Dobiveni ekstrakcijski prinos za klorofil *b* je 1,28 mg g⁻¹ s.t., a za karotenoide iznosi 1,19 mg g⁻¹ s.t.

6. LITERATURA

- Abou – Arab, A., Abou – Arab, A., Abu – Salem, M. F. (2010). Physico – chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *Afr. J. Food Sci.* **4**: 269-281.
- Ahmed M., Parsuraman, S. (2016) *Urtica dioica* L., (Urticaceae): A Stinging Nettle. *Sys. Rev. Pharm.* **5**: 6-8.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**: 261.
- Anonymous 1 (2019) Slika 1. Kopriva, <https://www.tportal.hr/vijesti/clanak/carobnica-kopriva-20120418/print>, Pristupljeno 31.05.2019.
- Anonymous 2 (2019) Slika 3. *Urtica dioica*, https://hr.wikipedia.org/wiki/Kopriva#/media/File:364_Urtica_dioeca.jpg, Pristupljeno 31.05.2019.
- Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E. (2014) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Food Eng.* **149**: 222-228.
- Bendicho, C., Lavilla, I. (2000) Ultrasound Extractions. U: Encyclopedia of Separation Science (Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cooke, M., Poole, C.F., ured.), Academic Press, str. 1448-1454.
- Berend, S., Grabari., Z. (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow – injection method. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **59**: 205-12.
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod. Proces.* **89**: 67-72.
- Bosiljkov, T., Karlović, S., Tripalo, B., Brnčić, M., Ježek, D., Rimac Brnčić, S., Penava, A., Karlović, D. (2010) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta („puls - jeka“) u otkrivanju oštećenja ambalažnog materijala i stranih tijela unutar pakovanja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **5 (1-2)**: 31-37.

- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava, A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra-red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre – treatment. *Afr. J. Biotech.* **9 (41)**: 6907.
- Carrea, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, G.C. (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chem. Acta.* **732**: 100-104.
- Chemat F., Grondin I., Shum Cheong Sing A., Smadja J. (2004) Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**: 13-15.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**: 7313-7352.
- Dent, M., Dragović Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.) *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29 (3)**: 475-484.
- Dragović Uzelac, V., Putnik, P., Zorić, Z., Bursać Kovačević, D. (2015) Winery by-products: anthocyanins recovery from red grape skin by high hydrostatic pressure extraction (HHPE) *Ann. Nutr. Metab.* **67**: 522-523.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., Mofardin, I. (2013) Ultrasound – assisted infrared drying of Pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.* **36**: 397.
- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Herceg, Z. (2014) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *Food Sci. Tech.* **62**: 894-900.
- Ferruzzi, G. M., Schwartz, J. S. (2001) Overview of chlorophylls in foods. *Current Protocols Food Anal. Chem.* F4.1.1.- F4.1.9.
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* **67**: 2589-2595.
- Fiedor, J., Burda, K., (2014) Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients.* **6**: 466-488.
- Fischbach, H. (1943) Microdeterminations for organically combined metal in pigment of okra. *J. Assoc. Agric. Chem.* **26**: 139-143.
- Fu, H., Chen, S., Chen R., Ding, W., Kuo – Hurang, L., Huang, R. (2006) Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain – inducing toxins in the stinging hairs of the nettle. *Ann Bot-London,* **98**: 57-65.

- Goncalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., Camara, J. S. (2013) An attractive, sensitive and high – throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC – PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchem. J.* **106**: 129-138.
- Grlić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2. izd., August Cesarec, Zagreb
- Guil Guerrero, J., Reboloso Fuentes, M., Torija Isasa, M. (2003) Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food. Compos Anal.* 111-119.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö., Oktay, M., Büyükkuroğlu, M. (2004) Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.* **90**: 205-215.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambrak Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Possibility of application high intensity ultrasound in milk industry. *Mljekarstvo.* **59**: 65.
- Hirano, T., Homma, M., Oka, K. (1994) Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase of the benign prostatic 394. hyperplasia. *Planta Med.* **60**: 30-33.
- HMPC (Committee on herbal medicinal products). Assesment report on *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., folium. European Medicines Agency. London, 2012.
- Hossain, M.B., Brunton, N.P. Patras, A., Tiwari, B., O Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **19**: 582-590.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**: 1821-1835.
- Ince, A. E., Sahin, S., Sumnu, G. (2014) Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J. Food Sci. Technol.* **51(10)**: 2776-2782.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Kilár, F. (2011) Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Res. Int.* **44**: 2851-2860.

- Jaeschke, D. P., Rech, R., Marczak, L. D. F., Mercali, G. D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresour. Technol.* **224**: 753-757
- Joshi, B., Mukhija, M., Kalia, A. Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. (2014) *Int. J. of Green Pharm.* **16**: 201-207.
- Kazazić, P. S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**: 279-290.
- Khan, M. K., Albert Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., Chemat, F. (2010) Ultrasound assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food. Chem.* **119**: 851.
- Klen, T. J., Vodopivec, B. M. (2012) Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food. Chem.* **134**: 2481.
- Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H., & Xia, C. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* **51(9)**: 2006–2013.
- Körpe, D., İşerî, Ö., Sahin, F., Cabi, E., Haberal, M. (2012) High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **64**: 355-362.
- Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., Kizek, R. (2010) Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.) *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **7**: 3804-3815.
- Lelas, V. (2008) Procesi pripreme hrane, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, str. 16-18.
- Li, Y., Tixier, F., A. S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat F. (2013) Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrason. Sonochem.* **20**: 12–18
- Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 1-24.
- Luque Garcia, J. L., Luque de Castro, M. D. (2003) Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trac. Trend Anal. Chem.* **22**: 41-47.
- Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Mason, T.J. (1992) *Practical Sonochemistry: User's Guide to Applications in Chemistry and Chemical Engineering*, Ellis Horwood Ltd, New York.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B. (2002) Phytosterols, Phytostanols, and Their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-Promoting Uses. *Prog. Lipid Res.* **41**: 457-500.
- Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci. World J.* 1-12.
- Özen, T., Korkmaz, H. (2003) Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine.* **10**: 405-415.
- Proestos, C., Komaitis, M. (2006) Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *J. Food Qual.* **29**: 567-582.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Penić, M., Dragović Uzelac, V. (2016) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Anal. Methods.* **9(8)**: 2385-2394.
- Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D., Ravi Kumar, M. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* **113**: 189-207.
- Repić, D. (2014) Slika 2. Žarna dlaka na listu koprive, <https://mikrosvijet.wordpress.com/2014/10/07/kopriva-trihomi/>, Pristupljeno 31.05.2019.
- Režek Jambrak, A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno biotehnološki fakultet, Disertacija, Zagreb.
- Riedel, S.L., Bader, J., Brigham, C.J., Budde, C.F., Yusof, Z.A., Rha, C., Sinskey, A.J. (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **109**: 74-83.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**: 401-436.
- Rosello Soto, E., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Orlie, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B. K., Barba, F. J. (2015) Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds

processing: Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **42**: 134.

- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003) Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr.* **1012**: 119-128.
- Rostagno, M.A., Prado, J.M. (2013) Natural product extraction: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo Martínez, J. (2008) The Power of Ultrasound. U: Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications (Capelo Martínez, J.L., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1-15.
- Schafner, W., Häfelfinger, B., Ernst, B.(2004) Ljekovito bilje - kompendij. Leo-commerce, Rijeka, str. 282-283.
- Schanderl, S. H., Marsh, G. L., Chinchester, C. O. (1965) Color reversion in processed vegetables and studies on re-greened pea purees. *J. Food Sci.* **30**: 320-326.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014). Influence of extraction technique on the anti – oxidative potential of haethorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science.* **98(4)**: 828-834.
- Spina, M., Cuccioloni, M., Sparapani, L., Acciarr, S., Eleuteri, A., Fioretti, E., Angeletti, M. (2008) Comparative evaluation of flavanoid content in assessing quality of wild and cultivated vegetables for human consumption. *J. Sci. Food. Agr.* **88**: 294-304.
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4 (9)**: 63-69.
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S. (2015) Optimisation of Ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* **29**: 231.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) Stress Physiology. U: Plant Physiology (Bressan, R.A., Lacy R.B.,ured.), Sinauer Associates, Sunderland, str. 591-614.
- Upton, R. (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J. Herb. Med.* 9-38.
- Veličković, D., Milenović, D., Ristić, M., Veljković, V. (2006) Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrason. Sonochem.* **13(2)**: 150-156.

- Vilkhū, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Inno. Food. Sci. Emerg. Technol.* **9**: 161.
- Viro, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **17 (6)**: 1066.
- Vorobiev E., Chemat, F. (2010) Principles of physically assisted extractions and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. U: Separation, extraction and concentration processes (Rizvi, S.S.H, ured). Woodhead Publishing Limited, Oxford, str. 94.
- Wang, H., Provan, G. J., Helliwel, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food. Chem.* **87**: 307.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* **17**: 300.
- Yolmeh, M., Najafi, M.B.H., Farhoosh, R. (2014) Optimisation of ultrasound – assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chem.* **155**: 319-324.
- Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M, Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M.J., Saraiva, J., Patras, A., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015) Fruit juice sonication: Implications on food safety, physicochemical and nutritional properties. *Food Res. Int.* **77 (4)**: 743-752.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Marijana Jurković

Marijana Jurković