

Utjecaj vrste otapala na antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista smokve

Štriga, Doroteja

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:952525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-06**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Doroteja Štriga

7634/PT

**UTJECAJ VRSTE OTAPALA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET
EKSTRAKTA LISTA SMOKVE**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020

Mentor: Prof.dr.sc. Branka Levaj

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj vrste otapala na antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista smokve

Doroteja Štriga, 0058213415

Sažetak: List smokve sadrži veliku količinu bioaktivnih spojeva koji zbog svojih antioksidacijskih svojstava djeluju poželjno na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je istražiti kako otapala: deionizirana voda, 40%-tni etanol i 96%-tni etanol utječu na ekstrakciju bioaktivnih spojeva tako što se mjerio antioksidacijski kapacitet ekstrakata FRAP metodom. Ekstrakcija je bila potpomognuta mikrovalnim zračenjem. Analizirani su listovi 9 sorti smokve: Miljska figa, Zimica, Tiger, Fico della Madonna, Petrovača bijela, Sušioka, Bjelica, Petrovača crna i Šaraguja te peteljka lista nepoznate sorte u čijim ekstraktima je izmjeren najmanji antioksidacijski kapacitet. Općenito, najveći antioksidacijski kapacitet postignut je uz primjenu 40%-tnog etanola. Neovisno o vrsti otapala, sortama Zimica i Fico della Madonna izmjeren je najveći antioksidacijski kapacitet, dok je najmanji antioksidacijski kapacitet određen u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu lista, sorata Sušioka i Bjelica, te u 96%-tnom etanolnom ekstraktu sorti Tiger i Sušioka.

Ključne riječi: FRAP metoda, list smokve, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 30 stranica, 7 slika, 1 tablicu, 48 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Dr. sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: Ana Dobrinčić, mag. ing.

Datum obrane: 1. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology**

Solvents impact on antioxidant capacity of fig leaf extract

Doroteja Štriga, 0058213415

Abstract: Fig leaf contains a large amount of bioactive compounds that due to their antioxidant properties have a beneficial effect on human health. The aim of this study was to investigate influence of various type of solvents (deionized water, 40% ethanol and 96% ethanol) on the extraction of bioactive compounds by measuring the antioxidant capacity of the extracts by the FRAP method. The extraction was assisted by microwave irradiation. The leaves of 9 fig cultivars were analyzed: Miljska figa, Zimica, Tiger, Fico della Madonna, Petrovača bijela, Sušioka, Bjelica, Petrovača crna and Šaraguja and the leaf stem of an unknown cultivars in which extracts the lowest antioxidant capacity was measured. Generally, the highest antioxidant capacity was achieved in the extract with the 40% ethanol. Independently to the type of solvent in the cultivars Zimica and Fico della Madonna, the highest antioxidant capacity was measured. While the lowest antioxidant capacity was determined in the aqueous and 40% ethanolic extract of the cultivars Sušioka and Bjelica, as well as in the 96% ethanolic extract of the cultivars Tiger and Sušioka.

Keywords: FRAP method, fig leaf, microwave-assisted extraction

Thesis contains: 30 pages, 7 figures, 1 table, 48 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Branka Levaj, Professor

Technical support and assistance: Ana Dobrinčić, mag. ing. preh. tech. aliment.

Defence date: July 1st 2021



Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.



Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SMOKVA.....	2
2.1.1. Kemijski sastav lista i utjecaj na zdravlje.....	4
2.2. EKSTRAKCIJA	6
2.2.1. Mikrovalna ekstrakcija.....	7
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	10
2.3.1. Metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	10
2.3.2. FRAP metoda	12
2.3.3. Antioksidacijski kapacitet lista smokve	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. Uzorci lista smokve	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Uređaji	15
3.1.4. Laboratorijski pribor	15
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Mikrovalna ekstrakcija.....	16
3.2.2. Antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJUČAK	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Smokva (*Ficus carica* L.) se smatra jednom od najstarijih uzgajanih biljnih vrsta. Ljudi su je stoljećima uzgajali zbog ukusnog ploda koji se može jesti svjež i osušen, ali i zato jer su znali da biljka posjeduje ljekovita svojstva. Na cijelom Mediteranskom području odlično uspijeva, u čemu ne zaostaje ni Hrvatska gdje se uzgaja u cijelom priobalnom području.

Mnoga današnja istraživanja, rađena na smokvi, usmjerena su i na list. Utvrđeno je da on posjeduje mnoge bioaktivne spojeve zbog kojih ima poželjan utjecaj na ljudsko zdravlje. Brojna i raznovrsna skupina bioaktivnih spojeva su fenolni spojevi koji su predmet mnogih istraživanja bilo da je riječ o njihovoj strukturi, svojstvima poput antioksidacijske aktivnosti, utjecaju na zdravlje i sl. U određenoj mjeri utvrđena je pozitivna korelacija količine fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u različitim biljkama. Također, pozitivan utjecaj fenolnih spojeva na zdravlje ljudi, povezuje se s njihovom antioksidacijskom aktivnosti.

Iako se list ne koristi u velikoj mjeri, potencijalan je izvor vrijednih spojeva, kao što su fenolni. Stoga bi se fenolni spojevi mogli ekstrahirati iz lista i dalje koristiti za proizvodnju različitih visokovrijednih proizvoda, zbog čega je posebno važno provesti ekstrakciju uspješno u kvantitativnom i kvalitativnom smislu. Postoji cijeli niz ekstrakcijskih metoda koje se koriste za ekstrakciju fenolnih spojeva, a jedna od učinkovitijih je mikrovalna ekstrakcija. Na uspješnost ekstrakcije uvelike utječe i vrsta upotrijebljenog otapala, a uspješnost ekstrakcije se, osim određivanjem udjela fenolnih spojeva, može ispitati i određivanjem antioksidacijskog kapaciteta. Jedna od često korištenih je FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda.

U skladu s navedenim, cilj ovog rada bio je ispitati kako različita otapala (deionizirana voda, 40%-tni i 96%-tni etanol), redom polarna s visokom dielektričnom konstantom, koja dobro apsorbiraju mikrovalno zračenje, utječu na ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz lista smokve, odnosno na antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata, mjeren spektrofotometrijskom FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SMOKVA

Smokva (*Ficus*) je jedan od 40 biljnih rodova iz porodice dudova (*Moraceae*), a obuhvaća više od 800 vrsta koje sadrže mnogobrojne varijetete koji imaju značajne genetske razlike i odlične farmakološke aktivnosti koje su od komercijalne važnosti (Chawla i sur., 2012). Smokve se uzgajaju više od 11,000 godina te su najstarije kultivirane biljke (Chawla i sur., 2012). Kada se kaže smokva, obično se misli na drvo smokve i njegov plod, točnije na 'Običnu smokvu' (*Ficus carica*) koja potječe s područja istočnog Mediterana i jugozapadne Azije, preciznije s teritorija između Grčke i Afganistana. Na cijelom području na kojem se smokva uzgaja, uzgaja se zbog svojeg jestivog ploda (Khatib i Vaya, 2010). Raste u tropskim i suptropskim regijama (Veberic i Mikulic-Petkovsek, 2016). Smokve su listopadno drveće čiji je rast više ograničen niskim temperaturama kakve dolaze zimi, nego ljetnim vrućinama. Područja koja su najbolja za uzgoj smokava imaju vruća i suha ljeta, nisku relativnu vlažnost i blage zime (Flaishman i sur., 2008).

Proizvodnja smokve počela je blago rasti u zadnjih nekoliko godina prema međunarodnoj Organizaciji za hranu i poljoprivredu, a pet najvećih proizvođača na svijetu su Turska, Egipat, Maroko, Alžir i Iran. Uzevši u obzir desetogodišnji prosjek, proizvede se oko 1,1 milijun tona godišnje. Turska kao najveći proizvođač, 2019. godine proizvela je 310,000 tona što je 23,56% ukupne svjetske proizvodnje, a iste godine pet najvećih proizvođača proizvelo je preko 70% smokve na svjetskom tržištu. Smokva se najviše uzgaja na Mediteranu i Bliskom istoku, iako se u posljednjih dvadesetak godina sve više uzgaja u SAD-u, Brazilu, Kini, Indiji i Japanu gdje je proizvodnja u kontinuiranom porastu (FAOSTAT, 2021).

U razdoblju od 3 do 5 godina od sadnje, stabla dosegnu puni kapacitet uroda, a nakon 15-20 godina plodnost stabala opada (Flaishman i sur., 2008). Ako se stablo smokve ostavi da raste slobodno, može doseći visinu od 15 metara (Flaishman i sur., 2008), izrasti u nepravilno razgranato drvo ili veliki grm (Ali i sur., 2012). Međutim, u voćnjacima visina stabla se obrezivanjem drži na visini od 3 metra iz razloga lakšeg ubiranja plodova (Flaishman i sur., 2008). Sustav korijenja je plitak i širi se tako da može prekriti 15 m tla. Ukoliko drvo raste na propusnom tlu, neki od korijena mogu se spustiti i do 6 m u dubinu. Drvo smokve ima brojne grane koje su cilindričnog oblika, glatke blijedosive ili crvenkaste kore (Ali i sur., 2012). Lateks biljke je mliječno bijele boje te sadrži ficin, enzim koji probavlja proteine.

Plod je kuglast, a kada potpuno sazrije poprimi zeleno-žutu ili crveno-ljubičastu nijansu, ovisno o sorti. Meso zrelog ploda je bjelkasto, žuto, jantarno, ružičasto, crveno do ljubičasto. Zrela smokva je slatka, mekana i sočna, a nezrela je gumenasta s lateksom (Veberic i Mikulic-Petkovsek, 2016). Veličina ploda je 3-5 cm. Plod smokve, u botaničkom smislu je maleni oraščić sa sjemenkom koji se razvije iz plodice cvjeta. U gospodarskom smislu, plod predstavlja kompleksnu cjelinu, nepravi, složeni plod, u čijoj unutrašnjosti se nalaze brojni cvjetovi, točnije cvat, te su cvjetovi i sjemenke zajedno srasli, a s vanjske strane je prekriven tankom, mekom pokožicom (Prgomet i Prgomet, 2020).

Smokva daje jedan ili dva uroda godišnje, prvi se razvija u proljeće iz cvjetova od prošle godine, a plod sazrijeva početkom srpnja, dok se drugi urod razvija za vrijeme ljetnih mjeseci iz cvjetova koji su se razvili tekuće godine, a zreli plodovi budu krajem kolovoza. Također, plodovi prve i druge berbe mogu se razlikovati oblikom i veličinom (Lodhi i sur., 1969).

Nakon berbe, smokve imaju kratak vijek trajanja, svega 7-10 dana. No, ako se skladište na niskoj temperaturi i u atmosferi obogaćenoj CO₂, mogu se čuvati 2-4 tjedna. Plodovi smokve mogu se jesti svježi ili osušeni i često se koriste u proizvodnji džema (Khatib i Vaya, 2010), i drugih poslastica kao što je kompot i salama od smokava, vino od smokava, smokvenjak ili kruh od smokava i dr. (Prgomet i Prgomet, 2020). Sušenjem se smokvama produžuje trajnost te su vrlo popularne kao suho voće (Veberic i sur., 2008). Od svog sušenog voća, smokve imaju najbolji sastav obzirom na hranjivu vrijednost (Khatib i Vaya, 2010).

Lisne plojke se međusobno razlikuju oblikom i veličinom što znači da je u smokve izražena tzv. heterofilija (Veberic i Mikulic-Petkovsek, 2016), koja može biti posljedica utjecaja okoline (inducirana) ili ontogenetičkog razvoja (generativna) (Bandelj Mavsar i sur., 2008). Boja lista može biti svijetlozelena, zelena ili tamnozeleno, a žile mogu biti vidljive, slabo vidljive ili nevidljive. Također, mogu, ali i ne moraju biti prisutne dlačice na licu, odnosno naličju lista. Površina lisne plohe (duljina x širina) kreće se od manje od 250 cm² pa do preko 550 cm². Isto tako, rub lista može biti ravan, nazupčan, jednakomjerno ili nejednakomjerno valovit i dr. (Bandelj Mavsar i sur., 2008). Plojka lista razdijeljena je u tzv. lapove kojih može biti tri, obično ih je pet, a ponekad i sedam (Prgomet i Prgomet, 2020). Peteljka lista, ovisno o sorti, je različitih duljina i debljina te po obliku okrugla ili plosnata, a boja može biti svijetlozelena, zelena, roza ili smeđa (Bandelj Mavsar i sur., 2008). Zbog svog vrijednog kemijskog sastava, list smokve se koristi u narodnoj medicini, a sve više je i predmet brojnih znanstvenih istraživanja kako vezano za njegov sastav tako i za njegov utjecaj na zdravlje ljudi.

2.1.1. Kemijski sastav lista i utjecaj na zdravlje

List smokve sadrži 67,6% vlage, a ostatak je suha tvar od čega 4,3% čine proteini, 1,7% masti, 4,7% sirova vlakna te 5,3% pepeo (Ahmad i sur., 2013). U listu smokve nalaze se različiti sekundarni biljni metaboliti od kojih mnogi imaju bioaktivna svojstva. Neki od njih su hlapivi spojevi (terpeni, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri), a neki nehlapljivi poput organskih kiselina i fenolnih spojeva (fenolne kiseline, flavonoidi, kumarini). Od terpena u različitim dijelovima smokve pa tako i u listu pronađeni su mentol, τ -muurolen i τ -kadinen terpeni. Također, u listu su od alkohola pronađeni: 2-metil-1-butanol, 1-heptanol, 1-penten-3-ol, benzil alkohol i (E)-2-nonen-1-ol. Uobičajeni aldehidi u listu su 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, (E)-2-pentenal, heksanal i (E)-2-heksenal, a ketoni 3-hidroksi-2-butanon, 6-metil-5-hepten-2-on i 3-pentanon. Od estera prisutni su metil butanoat, heksil acetat, etil benzoat i metil heksanoat. U lišću smokve identificirane su sljedeće organske kiseline: šikimska, jabučna, oksalna, fumarna, limunska te kininska kiselina koja je zabilježena samo u listu, a u ostalim dijelovima smokve ne. U listu su pronađeni steroli (β -sitosterol) i triterpenoidi (metil maslinat, oleanolna kiselina, taraksasterol, w-taraksasterolski ester, kalotropenil acetat, bauerenol, 24-metilencikloartanol, lupeol, lupeol acetat i stigmasterol).

Od različitih kemijskih spojeva koji su pronađeni u listu smokve, među najvažnijima su fenolni spojevi. U biljkama, oni imaju fiziološku ulogu, a mnogim stručnjacima su zanimljivi jer imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. U lišću su pronađeni derivati hidroksibenzojeve kiseline (di-pentozid galne kiseline, heksozid siriginske kiseline, heksozid vanilinske kiseline, malat siriginske kiseline) i derivati hidroksicimetne kiseline (malat kava kiseline, malat kumarinske kiseline, malat sinapinske kiseline i malat ferulinske kiseline). Koncentracija derivata hidroksicimetne kiseline bila je viša u ekstraktima lišća, nego u ostalim dijelovima smokve. U lišću, ali i plodovima zabilježena je hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, heksozid i pentozid dihidroksibenzojeve kiseline, glukozid vanilinske kiseline, dipentozid galne kiseline, hidroksicimetna kiselina, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina. U listu su prisutni su različiti flavonoidi: flavonoli (kvercetin, rutin), flavoni (luteolin, apigenin), flavanoni (naringenin), flavanoli ((+)-katehin, (-)-epikatehin) (Solana i Romano, 2020).

Kako je list smokve bogat različitim fenolnim spojevima mnoga istraživanja usmjerena su u tom pravcu. Ergül i sur. (2018) došli su do zaključka da metanolni ekstrakt s ekstrahiranim bioaktivnim spojevima iz suhog lista *Ficus carica* djeluje antioksidacijski, antidijabetički i antikancerogeno. Također, zaključili su da postoji povezanost između ukupnog sadržaja fenola, antioksidacijskog i antikancerogenog djelovanja, te da bi se list smokve mogao koristiti

kao sirovina za razvoj potencijalnih terapijskih sredstava protiv kancerogenih oboljenja, dijabetesa, pa čak i Alzheimerove bolesti.

Nadalje, Begum i sur. (2020) utvrdili su i da etanolni ekstrakt lista smokve pokazuje dobra antioksidacijska svojstva, a također i antimikrobna. Točnije, utvrdili su da pokazuje antibakterijsko djelovanje na odabranim bakterijskim sojevima te da bi se mogao koristiti za liječenje zaraznih i kroničnih bolesti uzrokovanih mikrobima.

2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je operacija koja se danas intenzivno provodi na različitim područjima, kao što su poljoprivredne analize, prerada hrane i dobivanje lijekova (Chan i sur., 2017). Može se definirati kao postupak gdje se bioaktivne tvari izdvajaju iz biljnih dijelova pomoću odgovarajućeg otapala (Mukherjee, 2019). Postoje klasične metode ekstrakcije, ali se u posljednje vrijeme sve više razvijaju i primjenjuju moderne metode s ciljem da se skрати vrijeme rada, poveća učinkovitost ekstrakcije, smanji potrošnja otapala radi smanjenja troškova i zagađenja okoliša (Huang i sur., 2013). Neki od tradicionalnih postupaka ekstrakcije su Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija zagrijavanjem uz refluks, maceracija i ekstrakcija uz miješanje. Ono što ih karakterizira je dugo vrijeme provođenja ekstrakcije, potrebna je velika količina otapala i uzorka, viši su troškovi i više je ljudskog rada (Huang i sur., 2013). Maceracija je tehnika ekstrakcije u kojoj se kruti biljni materijal uranja u otapalo određenog polariteta s obzirom na spojeve iz uzorka koje se želi ekstrahirati. Može se provoditi uz zagrijavanje ili miješanje da bi se povećala učinkovitost procesa i ubrzalo vrijeme ekstrakcije (Garcia-Vaquero i sur., 2020). Soxhlet ekstrakcija provodi se u specijalnoj Soxhlet aparaturi gdje se uzorak stavlja u čahuru koja se kontinuirano puni otapalom iz destilacijske tikvice. U jednom trenutku otapalo u čahuri dosegne razinu prelijevanja i sifon usisava otapalo s ekstrahiranim spojevima natrag u destilacijsku tikvicu. Na taj način osigurava se protok otapala kroz uzorak sve dok se ne postigne potpuna ekstrakcija (Garcia-Vaquero i sur., 2020).

Moderne metode ekstrakcije su ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć enzima, ekstrakcija superkričnim CO₂, subkrična ekstrakcija vodom, ekstrakcija pod visokim tlakom, pulsirajuće električno polje i dr. Za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom može se koristiti ultrazvučna kupelj ili sonda (Lavilla i Bendicho, 2017). Ekstrakcija uz pomoć enzima učinkovita je metoda jer biljne stanice imaju složenu građu koja se sastoji od polisaharida, celuloze i proteina. Fenolni spojevi se lako esterificiraju sa ksilozom, arabinozom ili galaktozom jedinicama hemiceluloze u staničnoj stjenki ili se mogu povezati vodikovim vezama s škrobom ili drugim polisaharidima. Uz pomoć enzima, hidrolizom se može olakšati razgradnja staničnih stjenki te pospješiti oslobađanje fenola iz biljnog matriksa (Cheetangdee, 2019). Često se koristi ekstrakcija superkričnim CO₂, tj. ugljikovim dioksidom koji prelazi u superkrično stanje pri specifičnim uvjetima temperature i tlaka (31,1 °C i 7,38 MPa), jer se pokazao i kao vrlo dobro otapalo koje, također, sprječava reakcije oksidacije. Ostale prednosti CO₂ su što nije skup, netoksičan je, niske je viskoznosti i velika je brzina difuzije te nije teško postići potrebno superkrično stanje. Pri završetku ekstrakcije, otapalo se lako odvaja od ekstrakta smanjenjem tlaka pri čemu se CO₂ vraća u plinovito stanje (Walker i sur., 2007). Još

jedno jeftino i ekološki prihvatljivo otapalo je voda. No, njezina uporaba je ograničena zbog slabe učinkovitosti ekstrakcije organskih spojeva. Međutim, pri temperaturi od 374 °C i tlaku od 221 bar i dalje je u tekućem obliku, smanjen joj je polaritet, viskoznost i površinska napetost. Zbog promijenjenih svojstava, subkrična voda po svojstvima postaje sličnija organskim otapalima. Tako da je ekstrakcija subkričnom vodom jedna moderna i „zelena“ metoda ekstrakcije koju odlikuje selektivnost i brzina ekstrakcije (Liang i Fan, 2013). Osnova pulsirajućeg električnog polja je uništenje strukture stanične membrane pri čemu se povećava učinak ekstrakcije. U staničnoj membrani nalaze se dipolne molekule na koje djeluje električni potencijal i razdvaja ih prema njihovom naboju. Uslijed odbijanja nabijenih molekula na membrani se stvaraju pore što povećava njezinu propusnost. Na taj način olakšava se ekstrakcija i povećava se količina ekstrahiranih spojeva te se skraćuje vrijeme ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

2.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija je ekstrakcija pri kojoj se koristi mikrovalna energija za zagrijavanje otapala koje se nalazi u kontaktu s uzorkom kako bi željeni spojevi prešli iz čvrstog uzorka u otapalo (Mukherjee, 2019). Mikrovalne pećnice koriste neionizirajuće elektromagnetsko zračenje, koje oscilira u rasponu frekvencija od 0,3 do 300 GHz (Saha i sur., 2018). Pri mikrovalnom zračenju, zagrijavanje je selektivno i ciljano, a ne kao pri uobičajenim načinima zagrijavanja. Uz to, toplina se ne gubi u okoliš, već se zagrijavanje odvija u zatvorenom sustavu, odnosno ekstrakcijskoj ćeliji (Manousi i sur., 2019). Pri zagrijavanju mikrovalovima elektromagnetsko polje uzrokuje brzo okretanje iona u polarnom otapalu kao i okretanje polarnih molekula te se stvara snažno trenje zbog čega dolazi do zagrijavanja (Xue i sur., 2018). Polarne molekule nastoje se orijentirati u smjeru polja koje se mijenja, a kao posljedica toga je povećanje temperature. Da bi se otopina zagrijala koristi se frekvencija od 2450 MHz, a da bi zagrijavanje bilo uspješno koriste se dielektrična otapala i otapala koja imaju trajni dipol. Ako se koristi nepolarno otapalo koje nema polarizirane skupine, zagrijavanje će biti slabo (Manousi i sur., 2019). Toplina se širi kroz cijeli sadržaj ekstrakcijske ćelije, odnosno dolazi do volumetrijskog zagrijavanja što utječe na učinkovitost ekstrakcije (Xue i sur., 2018). Uslijed povećanja temperature, dolazi i do povećanja tlaka zbog čega stanična stjenka biljnog materijala puca, bioaktivne komponente se na taj način lakše oslobađaju u ekstrakcijsku otopinu, odnosno ubrzava se difuzijski proces (Xue i sur., 2018). Pri konvencionalnim tehnikama ekstrakcije postoji gradijent koncentracije bioaktivnih spojeva zbog čega dolazi do

njihovog difundiranja u otapalo. U tehnikama potpomognute ekstrakcije, kao što je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcijski mehanizam se sastoji od razbijanja biljnog materijala uslijed čega dolazi do elucije bioaktivnih spojeva u otapalo (Xue i sur., 2018). Na početku ekstrakcije dolazi do prodiranja otapala u biljni materijal. Kako počinje rasti temperatura u ekstrakcijskoj ćeliji, stvara se tlak unutar biljne stanice u obliku unutarstanične vlage. Najprije se širi vakuola koja pritišće staničnu membranu do stanične stjenke. Kada stanična stjenka više ne može podnijeti pritisak, puca, nakon čega bioaktivni sastojci eluiraju u okolno otapalo što se događa relativno brzo (Chan i sur., 2017).

Prednosti mikrovalne ekstrakcije su jednostavnost, brzina provođenja u svega nekoliko minuta, potrebno je manje otapala i manja je potrošnja energije za razliku od nekih tradicionalnih metoda (Manousi i sur., 2019). Količine otapala mogu biti do 10 puta manje od onih koje se koriste u tradicionalnim metodama (Saha i sur., 2018). Povišene temperature dovode do bolje ekstrakcije, ali treba obratiti pažnju na termolabilne komponente koje se mogu razgraditi na visokim temperaturama (Madej, 2009). Učinkovitost reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem ovisi o temperaturi, snazi mikrovalne pećnice, vremenu ekstrakcije, otapalu koje se koristi za ekstrakciju, ali i omjeru otapala i uzorka koji se stavlja u ekstrakcijsku ćeliju (Cheetangdee, 2019).

Danas mnogi istraživači teže k tome da zamijene tradicionalna toksična i hlapljiva organska otapala tzv. „zelenim“ otapalima kao što su ionske tekućine i duboka euteklična otapala (eng. deep eutectic solvent (DES)). Takva otapala karakterizira zanemariva hlapljivost, kemijska i toplinska stabilnost, nezapaljivost, velika sposobnost otapanja većine spojeva i prilagodljivost sastava otapala. Također, duboka euteklična otapala imaju veći kapacitet otapanja od organskih otapala jer otapanjem lignoceluloze uzrokuju oštećenja staničnih stjenki pa je proces difuzije brži. Učinkovitost ekstrakcije može se poboljšati i korištenjem odgovarajuće kombinacije komponenata s obzirom na ciljane spojeve koji se žele ekstrahirati (Wang i sur., 2017). Wang i sur. (2017) pripremili su duboko euteklično otapalo za ekstrakciju, bioaktivnih spojeva iz lista smokve, potpomognutu mikrovalnim zračenjem. Pripremljeni DES sadrži glicerol, ksilitol i D(-)-fruktozu u molarnom omjeru 3:3:3 te je pokazao poboljšane prinose ekstrakcije za promatrane spojeve. Zbog visokih prinosa ekstrakcije, skraćeno je vrijeme provođenja mikrovalne ekstrakcije.

Keskin i sur. (2012) istraživali su fitokemijski sastav lista smokve i kakvo antimikrobno djelovanje pokazuju ekstrakti lista smokve s obzirom na različita korištena ekstrakcijska otapala (etanol, metanol i voda). Etanolni ekstrakt lista smokve pokazao je najbolju antimikrobnu

aktivnost u usporedbi s metanolnim i vodenim ekstraktom. Zbog antibakterijskih svojstava mogao bi se iskoristiti u biljnim pripravcima protiv bakterijskih infekcija.

2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti te broje više od 8000 različitih fenolnih struktura. Prirodni fenoli mogu biti jednostavni (fenolne kiseline, flavonoidi) ili složeni, visoko polimerizirani (lignini, tanini). Flavonoidi su najčešća i najrasprostranjenija podskupina. Brojna istraživanja su usmjerena prema njihovoj identifikaciji i kvantifikaciji u različitim biljkama iz razloga što pokazuju širok spektar bioloških učinaka: antibakterijsko, antivirusno, antialergijsko, protuupalno, hepatoprotektivno, antitrombotičko, vazodilacijsko i antikancerogeno djelovanje. Razlog različitih bioloških funkcija je njihova sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i antioksidativna aktivnost (Soobrattee i sur., 2005).

Fenolne spojeve karakterizira barem jedan aromatski benzenski prsten, u strukturi, na koji je vezana najmanje jedna hidroksilna grupa (Zhou i Elias, 2013). Oni su antioksidansi, što znači da sprječavaju oksidaciju spojeva koji su podložni oksidaciji i onemogućuju djelovanje slobodnih radikala, odnosno oksidansa. Fenolni spojevi reagiraju sa slobodnim radikalima koji tada ne reagiraju sa staničnim dijelovima (Halliwell, 1990). Slobodni radikali sadrže nesporeni elektron u vanjskoj orbitali zbog čega su vrlo reaktivni i lako ulaze u kemijske reakcije s različitim staničnim komponentama (proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama i složenim ugljikohidratima) što je nepoželjno jer dolazi do peroksidacije lipida i proteina i oštećenja nukleinskih kiselina (Madkour, 2020). Fenolni prsten, nakon što preda elektron slobodnom radikalima, se može stabilizirati i delokalizirati nesporene elektrone, odnosno rezonancijski stabilizirati, pa prema tome, kroz različite načine djelovanja, ima antioksidativna svojstva. Primjerice, zaustavlja lančane reakcije uklanjanjem slobodnih radikala i reaktivnih vrsta oduzimanjem prooksidanata (npr. ioni željeza i bakra) i recikliranjem drugih antioksidanasa poput tokoferola. Antioksidativni kapacitet fenola ovisi o njihovoj strukturi, ovisno koliko imaju hidroksilnih skupina i na kojem položaju se te skupine nalaze (Cheetangdee, 2019).

2.3.1. Metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Najčešće korištene kolorimetrijske metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta su: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, PFRAP, ORAC, HORAC i TRAP metoda.

Često korištena metoda procjene antioksidacijske aktivnosti u nekom ekstraktu je DPPH metoda gdje specifični spojevi reagiraju sa slobodnim radikalom 2,2-difenil-1-pikril-hidrazilom (DPPH) te dolazi do njegove redukcije (Brand-Williams i sur., 1995). Test se temelji na sposobnosti uklanjanja antioksidansa u ekstraktu kojem se želi izmjeriti antioksidacijski

kapacitet. Oksidirani DPPH je tamno ljubičaste boje, a primitkom atoma vodika boja se gubi. Intenzitet apsorpcije zračenja mjeri se na 520 nm (Kedare i Singh, 2011).

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metoda, radi na principu da se bezbojna, reducirana molekula ABTS oksidira u ABTS^{•+} i poprimi karakterističnu plavo-zelenu boju. Kada se obojeni ABTS^{•+} pomiješa s ekstraktom u kojem se nalaze fenolni spojevi, on se reducira preuzevši elektrone od antioksidansa u ekstraktu i vraća se u svoj bezbojni ABTS oblik (Erel, 2004).

CUPRAC (eng. cupric ion reducing antioxidant capacity) metoda je pogodna za određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenola i vitamina C i E te koristi bakrov (II) neokuproin (Cu(II)-Nc) reagens koji je kromogeno oksidacijsko sredstvo. Mjeri se kolika je sposobnost polifenola da smanje koncentraciju bakrovog (II) iona pri čemu se promjena intenziteta obojenja mjeri na 450 nm, a boja je stabilna neko vrijeme (Apak i sur., 2004).

PFRAP (eng. potassium ferricyanide reducing power) je metoda u koje apsorbancija raste kako se povećava reducirajuća sposobnost antioksidansa u nekom uzorku. Princip se sastoji od reakcije antioksidansa s kalijevim fericijanidom pri čemu nastaje kalijev ferocijanid koji onda reagira s željezovim trikloridom te nastaje željezov ferocijanid – kompleks plave boje koji pokazuje maksimalnu apsorbanciju na 700 nm (Pisoschi i Ngulescu, 2011).

ORAC (eng. oxygen radical absorbance capacity) metoda temelji se na smanjenju fluorescencije proteina jer izgubi nativnu konformaciju uslijed oksidacijskog oštećenja koje uzrokuje peroksidni radikal. Mjeri se kolika je sposobnost antioksidansa u uzorku, čiji se antioksidacijski kapacitet želi ispitati, da zaštiti protein od oksidacijskih oštećenja (Zulueta i sur., 2009).

Još jedna fluorometrijska metoda je HORAC (eng. hydroxyl (HO) radical averting capacity) metoda koja se temelji na mjerenju metal-kelirajućeg djelovanja antioksidansa u uvjetima u kakvima se odvija Fenton reakcija. U metodi se koristi Co (II) kompleks (Pisoschi i Ngulescu, 2011).

U TRAP (eng. total peroxy radical trapping antioxidant parameter) metodi koristi se kemiluminiscencija (CL) koja je pojačana luminolom za praćenje reakcije koja uključuje peroksid-radikal. Rezultat termičke razgradnje 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) je nastanak luminol radikala koji daju kemiluminiscentni signal. Vrijeme u kojem uzorak gasi kemiluminiscencijski signal, zbog prisutnosti antioksidansa, je TRAP vrijednost (Pisoschi i Ngulescu, 2011).

2.3.2. FRAP metoda

FRAP (eng. Ferric reducing ability of plasma) je jednostavan „test“ kojim se može odrediti antioksidacijski kapacitet u nekoj otopini. Metoda se temelji na redukciji iona željeza, tako što se žuti kompleks feri-tripiridiltriazin (Fe(III)-TPTZ) reducira do plavo obojenog fero-tripiridiltriazina (Fe(II)-TPTZ), pri niskom pH. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski i pokazuje apsorpcijski maksimum na 593 nm, a izravno je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Dakle, pri FRAP metodi dolazi do prijenosa elektrona, gdje antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, ali i metalima i karbonilnim spojevima (Benzie i Strain, 1996). Reakcijski uvjeti moraju biti kiseli, stoga se koristi acetatni pufer čiji je pH 3,6. U takvim uvjetima osigurana je dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, uz to povećava se i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). Reakcija prijenosa elektrona odvija se u trajanju od 4 do 6 minuta što je relativno brzo. Na taj način može se izraziti antioksidacijski kapacitet onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju brzo, dok za spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta. Prednosti FRAP metode su dobra ponovljivost rezultata, jednostavna priprema reagensa, metoda nije skupa, a postupak provođenja je brz i jednostavan. Sve je to razlog zašto se uvelike koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Benzie i Strain, 1996).

2.3.3. Antioksidacijski kapacitet lista smokve

Pande i Akoh (2010) određivali su ukupne fenole Folin-Ciocalteu metodom i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom u listu smokve. Pripremili su hidrofilne i lipofilne frakcije. FRAP metodom u hidrofilnoj frakciji izmjeren je antioksidacijski kapacitet od $11,6 \pm 0,3 \mu\text{M TE/ g}$ svježeg lista smokve, a u lipofilnoj frakciji $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M TE/ g}$ svježeg lista smokve. Određivanjem ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti ne samo u listu, nego i u kožici ploda, pulpi i sjemenkama ploda te cijelom plodu, dobiveni rezultati pokazuju da postoji određena pozitivna korelacija između koncentracije polifenolnih spojeva i izmjerenog antioksidacijskog kapaciteta. Zanimljivo je da je u kori ploda smokve najveća količina polifenolnih spojeva, dok je u listu zabilježen najveći antioksidacijski kapacitet.

Konyalıoğlu i sur. (2005) određivali su α -tokoferol, flavonoide, fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost lista smokve. Antioksidacijski kapacitet je mjereno TAC metodom u

kojoj analit uzorka reducira Mo (VI) do Mo (V) pri čemu dolazi do promjene boje koja se mjeri spektrofotometrijski. Antioksidacijski kapacitet izmjeren u ekstraktu lišća *F. carica* iznosio je 14,0 – 23,5 mM α -tokoferol ekvivalent po g suhog uzorka. Vodeni ekstrakt pokazao je najveći antioksidacijski kapacitet od 23,5 mM α -tokoferol ekvivalent po g suhog uzorka, dok je etanolni ekstrakt bio 14,5 mM α -tokoferol ekvivalent po g suhog uzorka, tek nešto veći od ekstrakta n-heksana. I oni su došli do istog zaključka. Lišće smokve sadrži tvari koje pokazuju visoko antioksidacijsko djelovanje te postoji povezanost količine ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta. No, nije utvrđeno koji fenoli i flavonoidi imaju najveći antioksidacijski kapacitet pa su daljnja istraživanja usmjerena u tom pravcu.

Suliman i sur. (2021) istraživali su fenolni sastav, inhibiciju enzima i antioksidacijski kapacitet lista i peteljke *Ficus sycomorus*. Osušeni biljni materijal su samljeli i pripremili ekstrakte maceracijom u dva otapala: nepolarnom heksanolu i smjesi polarnih otapala diklormetan:etanol (DE) (1:1). U listu je utvrđen znatno veći sadržaj polifenola i flavonoida, dok je u peteljci pronađeno najviše tanina. Antioksidacijski kapacitet izmjeren FRAP metodom pokazuje znatno veći kapacitet u DE ekstraktu, nego u heksan ekstraktu i za list i za stabljiku *F. sycomorus*. Za usporedbu, u heksan ekstraktu lista izmjereno je $23,35 \pm 0,88$ mg TE/g suhog uzorka, a u DE ekstraktu lista $37,46 \pm 0,52$ mg TE/g suhog uzorka. *Ficus sycomorus* prirodan je i bogat izvor bioaktivnih molekula koje imaju antioksidacijska svojstva, zaključak je njihove studije prema dobivenim rezultatima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci lista smokve

Uzorci lista 9 različitih vrsta smokve (*Ficus sp.*) ubrani su u okolici Rovinja u listopadu 2020. godine (tablica 1). Isti su sušeni u zračnoj sušari na temperaturi 40-50 °C. Osušeni listovi i peteljke bili su pohranjeni u plastične vrećice do daljnje analize kako ne bi apsorbirali vlagu iz zraka.

LIST	PETELJKA
Miljska figa	Peteljke nepoznate sorte
Zimica	
Tiger	
Fico della Madonna	
Petrovača bijela	
Sušioka	
Bjelica	
Petrovača crna	
Šaraguja	

Tablica 1. Popis analiziranih uzoraka, odnosno sorti smokve

3.1.2. Kemikalije

Za mikrovalnu ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista smokve (*Ficus sp.*) i određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodom, upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- Etilni alkohol, 96%-tni, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- Klorovodična kiselina, 37%-tna, CARLO ERBA Reagents, Milano, Italija
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Željezov (III) klorid heksahidrat, Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Glacijalna octena kiselina, 99-100%-tna, CARLO ERBA Reagents, Milano, Italija
- Natrijev acetat trihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Deionizirana voda

3.1.3. Uređaji

- Mikrovalni ekstraktor - Ethos EASY – Advanced Microwave Digestion System, Milestone Srl, Sorisole, Italija
- UV/VIS spektrofotometar - UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD
- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g), Sartorius analytic A200S, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- Vortex miješalica – MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka
- Vodena kupelj – Heating Bath B-490, Büchi, Flawil, Švicarska
- Mlinac za mljevenje – GT110838, Tefal, Rumilly, Francuska

3.1.4. Laboratorijski pribor

- Automatske pipete, 10 μ L - 5 mL, Eppendorf, Hauppauge, New York, SAD
- Odmjerne tikvice od 50 mL, 100 mL i 1 L
- Menzure od 50 mL i 100mL
- Laboratorijske čaše od 50 mL i 200 mL
- Staklene epruvete
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- magneti
- kapaljke
- Plastične kivete s poklopcem od 50 mL
- Jednokratne plastične kivete
- Metalna špatula
- Plastična lađica za vaganje
- Staničevina

3.2. METODE

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz osušenih i usitnjenih listova smokve provedena je pomoću mikrovalova pri čemu su za ekstrakciju korištena tri različita otapala: deionizirana voda, 40%-tni i 96%-tni etanol. U dobivenim ekstraktima, spektrofotometrijski, se određivao ukupni antioksidacijski kapacitet FRAP metodom (Benzie i Strain, 1996; Benzie, 1996).

3.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

Priprema uzorka

Neposredno prije ekstrakcije osušeni listovi (bez peteljke) su usitnjeni, pomoću mlinca za mljevenje, kako bi ekstrakcija bila učinkovitija. Odvojeno je samljevana i peteljka da bi se iz nje ekstrahirali bioaktivni spojevi i na isti način odredio antioksidacijski kapacitet.

Mikrovalna ekstrakcija

Na analitičkoj vagi izvagan je 1 g ($\pm 0,1$ g) usitnjenog lista smokve. Potom je u ekstrakcijsku ćeliju dodano oko 40 mL otapala: deionizirane vode, 40%-tni etanol, odnosno 96%-tni etanol i magnet za miješanje. Ekstrakcijske ćelije se zatvore i stave na pozicije u samom uređaju (slika 1). Mikrovalna ekstrakcija se provodi 10 min na 55 °C. Od 10 minuta, u prvoj minuti je zagrijavanje do 55 °C, a u zadnjoj minuti hlađenje. Snaga mikrovalnog ekstraktora postavljena je na 800 W. Po završetku ekstrakcije, svaki od 9 uzoraka lista i peteljka u tri različita otapala filtrirani su pomoću običnog filter papira i razrijeđeni na volumen od 50 mL u odmjernoj tikvici (slika 2). Do daljnje analize, uzorci su pohranjeni u plastičnu kivetu na hladnom i tamnom mjestu.



Slika 1. Mikrovalni ekstraktor - Ethos EASY – Advanced Microwave Digestion System (vlastita fotografija)



Slika 2. Filtracija (vlastita fotografija)

3.2.2. Antioksidacijski kapacitet FRAP metodom

3.2.2.1. Princip metode

FRAP metodom se može odrediti ukupna antioksidacijska snaga jer antioksidansi prisutni u ekstraktu reduciraju kompleks Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u kiseloj sredini i pritom nastaje Fe^{2+} -TPTZ kompleks koji je intenzivne plave boje. Spektrofotometrijski izmjeren intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji antioksidansa u uzorku. Apsorpcijski maksimum mjeri se na 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

3.2.2.2. Priprema FRAP reagensa

FRAP reagens sadrži acetatni pufer (0,3 M), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagens (10 mM) i vodenu otopinu željezova (III) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1.

40 mM klorovodična kiselina pripremi se tako da se otpipetira 330 μL 37%-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake deioniziranom vodom. Nakon toga, može se pripremiti TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM. Odvaži se 0,1560 g u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni 40 mM klorovodičnom kiselinom do oznake. Vodena otopina željezova (III) klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM, priprema se iz 0,541 g željezova (III) klorida heksahidrata koji se izvaži u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni do oznake deioniziranom vodom. 0,3 M acetatni pufer, čiji je pH 3,6, priprema

se tako da se 3,1 g natrijevog acetata trihidrata, odvagano u plastičnoj ladici kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1 L pomoću deionizirane vode. Potom se otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i tikvica se nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

Na kraju, FRAP reagens se pripremi u staklenoj laboratorijskoj čaši volumena 200 mL tako da se pomiješa 100 mL acetatnog pufera (0,3 M), 10 mL TPTZ reagensa i 10 mL željezova (III) klorida.

3.2.2.3. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta

U staklene epruvete otpipetira se 240 μ L deionizirane vode, 80 μ L uzorka i 2080 μ L prethodno pripremljenog FRAP reagensa. Sadržaj u epruveti se dobro pomiješa pomoću Vortex mješalice te se epruvete stave u vodenu kupelj na termostatanje 5 min na 37 °C. Potom se mjeri apsorbancija na 593 nm (Slika 3). U slijepu probu se umjesto 80 μ L uzorka dodaje isti volumen ekstrakcijskog otapala: deionizirana voda, 40%-tni, odnosno 96%-tni etanol. Svako mjerenje rađeno je u duplikatu.



Slika 3. UV/VIS spektrofotometar – VWR UV-1600PC Spectrophotometer (vlastita fotografija)

3.2.2.4. Izračun antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet se izračunava pomoću baždarnog pravca koji pokazuje linearnu ovisnost apsorbancije mjerene na 593 nm o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Troloxa). Izrada baždarnog pravca počinje

pripremom 2 mM otopine Troloxa, tako što se izvaže 0,0501 g Troloxa i odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se zatim nadopuni 96%-tnim etanolom, do oznake. U odmjernim tikvicama od 10 mL rade se razrjeđenja od pripremljene otopine Troloxa. Redom se u tikvice otpipetira 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa te se tikvice nadopune do oznake 96%-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol/L}$. Priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija na 593 nm. Jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2 = 0,9995)$$

Gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

R^2 – koeficijent determinacije

$$X (mg g^{-1}) = \frac{X (\mu\text{mol L}^{-1})}{1000} \times \frac{V (L)}{m (g)} \times \text{razrjeđenje} \times M (mg mmol^{-1})$$

$$M (\text{Trolox}) = 250,29 mg mmol^{-1}$$

Dobivene apsorbancije (Y) uzoraka uvrste se jednadžbu baždarnog pravca te se izračuna antioksidacijski kapacitet kao Trolox ekvivalent (TE) u $\mu\text{mol/L}$. Dobivena koncentracija pomnoži se s brojem razrjeđenja i podijeli s koeficijentom 1000 pri čemu se dobije koncentracija u mmol/L koja se podijeli s masenom koncentracijom da bi se koncentracija izrazila po gramu suhog lista. Masena koncentracija ekvivalentna je omjeru mase (m) samljevenog suhog lista smokve korištenog za ekstrakciju i konačnog volumena (V) na koji je razrijeđen ekstrakt. Na kraju se koncentracija u $\text{mmol po gramu suhog lista}$ pomnoži s molarnom masom Troloxa (M) te je u konačnici antioksidacijski kapacitet (X) izražen u $\text{mg TE po g osušenog lista smokve}$ kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati provedenog pokusa prikazani su grafički (Slika 4. – 6.).



Slika 4. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta (mg TE / g s. tv.) dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenog lista smokve uz deioniziranu vodu kao otapalo

Rezultati izmjenog antioksidacijskog kapaciteta u vodenim ekstraktima (slika 4) kreću se od 8,12 mg TE / g suhog lista pa do 24,78 mg TE / g suhog lista. Najveći antioksidacijski kapacitet pokazuje sorta Zimica, a druga po redu je Fico della Madonna sorta. S druge strane, najmanji antioksidacijski kapacitet izmjerena je u sorti Sušioka te nešto veći u Bjelici. Zimica ima tri puta veći antioksidacijski kapacitet od Sušioke.



Slika 5. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta (mg TE / g s. tv.) dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenog lista smokve uz 40%-tni etanol kao otapalo

U ekstraktu 40%-tnog etanola (slika 5) izmjerena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta kreće se od 10,41 mg TE / g suhog lista pa sve do 27,99 mg TE / g suhog lista. Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je u ekstraktu Zimice, a nešto niži u ekstraktu Fico della Madonna sorte. Najmanji antioksidacijski kapacitet ima Bjelica, a nešto viši Sušioka.

U 96%-tnom etanolnom ekstraktu (slika 6) najveći antioksidacijski kapacitet je izmjeren u sortama Fico della Madonna te Zimica, a najmanji kod Tiger i nešto veći u Sušioki. Vrijednosti izmjerenog kapaciteta kreću se od 2,93 pa do 7,38 mg TE / g suhog lista.



Slika 6. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta (mg TE / g s. tv.) dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenog lista smokve uz 96%-tni etanol kao otapalo

U vodenom ekstraktu i 40%-tnom etanolnom ekstraktu najveći antioksidacijski kapacitet pokazuju sorte Zimica i Fico della Madonna, samo što su vrijednosti u vodenim ekstraktima nešto niže. Slično je i u 96%-tnom etanolnom ekstraktu, uz razliku što Fico della Madonna pokazuje veći antioksidacijski kapacitet od Zimice. S druge strane, najmanji antioksidacijski kapacitet u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu izmjeren je u Sušioki i Bjelici, s tim da je u vodenom ekstraktu manja vrijednost određena u Sušioki, a u 40%-tnom etanolnom ekstraktu u Bjelici. Iznenaduje podatak da u 96%-tnom etanolnom ekstraktu najmanji antioksidacijski kapacitet pokazuje sorta Tiger koja u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu pokazuje neku srednju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Tek nešto veća vrijednost od Tiger sorte je određena u sorti Sušioka.

Prema dobivenim rezultatima najveći antioksidacijski kapacitet za većinu sorti smokve izmjeren je u 40%-tnom etanolu koji je korišten kao ekstrakcijsko otapalo. No, valja napomenuti da izmjeren antioksidacijski kapacitet, ako je korištena voda nije bitno manji od onog u 40%-tnom etanolu. Isto tako, u ekstrakcijskim otapalima deionizirana voda i 40%-tni etanol izmjeren je daleko veći antioksidacijski kapacitet koji iznosi od 8,12 mg TE / g suhog lista pa sve do 27,99 mg TE / g suhog lista, za razliku od vrijednosti koje su izmjerene ukoliko

je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 96%-tni etanol, gdje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ne prelaze 7,38 mg TE / g suhog lista smokve.



Slika 7. Grafički prikaz prosječne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (mg TE / g s. tv.) ekstrakta listova za sve sorte za pojedina otapala prikazane zajedno s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta (mg TE / g s. tv.) izmjerene za peteljku u pojedinim otapalima.

Grafički (slika 7) je najbolje vidljivo koliko je 40%-tni etanol koji se pokazao kao najbolje ekstrakcijsko otapalo bolji u odnosu na 96%-tni etanol koji se pokazao kao dosta loše otapalo. Gotovo četiri puta veći antioksidacijski kapacitet izmjeren je u 40%-tnim etanolnim, nego u 96%-tnim etanolnim ekstraktima lista. S druge strane, u ekstraktima peteljke određen je oko dva puta veći antioksidacijski kapacitet u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu, nego u 96%-tnom etanolnom ekstraktu.

Kao što je mjereno antioksidacijski kapacitet u osušenim listovima, mjereno je i u suhim peteljka listova. Vrijednosti su značajno niže od onih koje su izmjerene u listovima smokve, ali su, također, izmjerene veće vrijednosti u ekstrakcijskim otapalima voda i 40%-tni etanol (3,72 i 3,50 mg TE / g suhe peteljke), nego u 96%-tnom etanolu (1,70 mg TE / g suhe peteljke). Prema tome, jasno je vidljivo da se peteljka ne odlikuje velikim antioksidacijskim kapacitetom u usporedbi s listovima bilo koje u ovom radu analizirane sorte smokve.

Fenolni spojevi u najvećoj su mjeri odgovorni za antioksidacijski kapacitet koji je određen FRAP metodom. S obzirom na njihovu strukturu koja sadrži više hidroksilnih skupina,

topljivi su u vodi i polarnim otapalima, a slabije topljivi u etanolu što je vidljivo prema nižem izmjerenom antioksidacijskom kapacitetu u 96%-tnim etanolnim ekstraktima. Etanol je, s druge strane, dobro otapalo za klorofil zbog čega su ekstrakti s etanolom bili zeleniji od čistih vodenih ekstrakata (slika 2) (Derrien i sur., 2017).

Pande i Akoh (2010) dobili su rezultate antioksidacijskog kapaciteta koji su dosta niži u odnosu na one dobivene u ovom radu. Vrijednost koju su dobili najbliže je onima u 96%-tnom etanolu. Jedan od razloga može biti različita metoda ekstrakcije fenolnih spojeva. Ako se uspoređuje koje je otapalo najbolji odabir s obzirom na najveći izmjereni antioksidacijski kapacitet prema Konyalioğlu i sur. (2005) to je deionizirana voda, dok se etanol pokazao kao dosta lošim. Do sličnog zaključka došlo se i u ovom istraživanju, iako su Konyalioğlu i sur. (2005) koristili klasičnu maceraciju kao metodu ekstrakcije, a antioksidacijski kapacitet određivali TAC metodom. Suliman i sur. (2021) proučavali su *Ficus sycomorus*, koja spada u isti rod kao i *Ficus carica* koja se koristila u ovom istraživanju. Kako se ovdje nije radilo s nepolarnim ekstrakcijskim otapalom, može se usporediti vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjerene FRAP metodom u polarnom otapalu. Antioksidacijski kapacitet izmjeren u diklormetan:etanol (1:1) otapalu je za 25 % veći od najvećeg antioksidacijskog kapaciteta izmjenog u ovom istraživanju u sorti Zimica u 40%-tnom etanolnom ekstraktu. Alcántara i sur. (2020) su pokazali u svojem istraživanju da vodeni ekstrakt lišća smokve ima tri puta veći antioksidacijski kapacitet od 50%-tnog etanolnog ekstrakta dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom te četiri puta veći antioksidacijski kapacitet vodenog, u odnosu na 50%-tni etanolni ekstrakt koji je dobiven ultrazvučnom ekstrakcijom. U ovom istraživanju se pokazalo da vodeni i 40%-tni etanolni ekstrakti dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom imaju podjednake vrijednosti te je čak izmjeren nešto veći antioksidacijski kapacitet u 40%-tnom etanolnom ekstraktu. Nepodudarnost rezultata vjerojatno je posljedica korištenih različitih metoda ekstrakcije.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata, proizlaze sljedeći zaključci:

- U ekstrakcijskom otapalu deionizirana voda najveći izmjereni antioksidacijski kapacitet iznosi 24,78 mg TE / g suhog lista (sorta Zimica), a najmanji antioksidacijski kapacitet je 8,12 mg TE / g suhog lista (sorta Sušioka).
- U ekstraktu 40%-tnog etanola najveći antioksidacijski kapacitet iznosi 27,99 mg TE / g suhog lista (sorta Zimica), a najmanji izmjeren antioksidacijski kapacitet je 10,41 mg TE / g suhog lista (sorta Bjelica).
- U ekstrakcijskom otapalu 96%-tnog etanola najveći zabilježen antioksidacijski kapacitet izmjeren FRAP metodom iznosi 7,38 mg TE / g suhog lista (sorta Zimica), a najmanji 2,93 mg TE / g suhog lista (sorta Tiger).
- Peteljka ima znatno niži antioksidacijski kapacitet od lista smokve pri čemu su vrlo slične vrijednosti određene u vodenom (3,72 mg TE / g suhe peteljke) i 40%-tnom etanolnom ekstraktu (3,50 mg TE / g suhe peteljke), a dvostruko manje u 96%-tnom etanolnom ekstrakti (1,70 mg TE / g suhe peteljke).
- Najveći antioksidacijski kapacitet lista smokve izmjeren je u ekstraktu 40%-tnog etanola, nešto niže vrijednosti su u deioniziranoj vodi, dok su znatno niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta izmjerene u 96%-tnom etanolnom ekstraktu. Dakle, kao najbolje otapalo pokazao se 40%-tni etanol.
- FRAP metodom, izmjeren je najveći antioksidacijski kapacitet u sortama Zimica i Fico della Madonna u svim otapalima.

6. POPIS LITERATURE

Ahmad, S., Bhatti, F. R., Khaliq, F. H., Irshad, S., Madni, A. (2013) A review on the prosperous phytochemical and pharmacological effects of *Ficus carica*. *International Journal of Bioassays*, **2**(5), 843-849.

Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., García-Pérez, J. V., Režek Jambrak, A., Lorenzo, J. M., Collado, M. C., Granato, D., Barba, F. J. (2020) Effects of Ultrasound-Assisted Extraction and Solvent on the Phenolic Profile, Bacterial Growth, and Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities of Mediterranean Olive and Fig Leaves Extracts. *Molecules*, **25**, 1718.

Ali, B., Mujeeb, M., Aeri, V., Mir, S. R., Faiyazuddin, M., Shakeel, F. (2012) Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Ficus carica* Linn. leaves. *Natural product research*, **5**(26), 460-465.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970-7981.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) *Journal of Food Engineering*, **117**, 426-436.

Bandelj Mavsar, D., Bohanec, B., Bučar Miklavčič, M., Butinar, B., Javornik, B., Jakše, J., Podgornik, M., Prgomet, Ž., Skrt, A., Tomažič, I., Vrhovnik, I., Valenčič, V. (2008) Smokva (*Ficus carica* L.) u Istri: Morfološke, molekulske i neke kemijske osobine, Založba Annales, Kopar.

Begum, H. A., Humayun, M., Rauf, M., Gul, H., Ali, K., Khan, W., Schulze, M., Shah, M. (2020) Antimicrobial, antioxidant, phytochemical and pharmacognostic study of the leaf powder of *Ficus carica* L. *Pure and Applied Biology*, **9**(1), 999-1008.

Benzie, I.F.F. (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry* **29**(2), 111-116.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239**(1), 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food science and Technology*, **28**(1), 25-30.

- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G.C. (2017) An energy-based approach to scale up microwave-assisted extraction of plant bioactives. U: Ingredientsextraction by Physicochemical Methods in Food (Grumezescu, A. M. i Holban, A. M., ured.), Academic Press, SAD , str. 561-597.
- Chawla, A., Kaur, R., Sharma, A. K. (2012) *Ficus carica* Linn.: A review on it's pharmacognostic, phytochemical and pharmacological aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, **1**(4), 215-232.
- Cheetangdee, N. (2019) Rice Phenolics: Extraction, Characterization, and Utilization in Foods. U: Polyphenols in Plants, 2. izd. (Watson, R. R., ured.), Academic Press, SAD, str. 217-242.
- Cheetangdee, N. (2019) Rice Phenolics: Extraction, Characterization, and Utilization in Foods. U: Polyphenols in Plants, 2. izd. (Watson, R. R., ured.), Academic Press, SAD, str. 217-242.
- Derrien, M., Badr, A., Gosselin, A., Desjardins, Y., Angers, P. (2017) Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). *LWT- Food Science and Technology*, **79**, 170-177.
- Ergül, M., Ergül, M., Eruygur, N., Ataş, M., Uçar, E. (2018) *In vitro* evaluation of the chemical composition and various biological activities of *Ficus carica* leaf extracts. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, **16**(4), 401-409.
- FAOSTAT (2021) Food and agriculture organization of the United Nations <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> . Pristupljeno: 28. ožujka 2021.
- Flaishman, M. A., Rodov, V., Stover, E. (2008) The fig: botany, horticulture, and breeding. U: Horticultural reviews, volume 34, (Janick, J., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 113-196.
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., Tiwari, B. (2020) Conventional extraction techniques: Solvent extraction. U: Sustainable Seaweed Technologies: Cultivation, Biorefinery, and Applications, (Torres, M. D., Kraan, S., Dominguez, H., ured.), Elsevier, Nizozemska, str. 171-189.
- Halliwell, B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, **9**(1), 1-32.
- Huang, H. W., Hsu, C. P., Yang, B. B., Wang, C. Y., (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science & Technology*, **33**, 54-62.

- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, **48**(4), 412-422.
- Keskin, D., Ceyhan, N., Zorlu, Z., Ugur, A. (2012) Phytochemical analysis and antimicrobial activity of different extracts of fig leaves (*Ficus carica* L.) from west Anatolia against some pathogenic microorganisms. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **6**(3), 1105-1110.
- Khatib, S., Vaya, J. (2010) 17—Fig, Carob, Pistachio, and Health. U: Bioactive foods in promoting health: Fruits and vegetables, (Watson, R. R., Preedy, V. R., ured.), Academic Press, San Diego, str. 245–263.
- Konyalıoğlu, S., Sağlam, H., Kivçak, B. (2005) α -tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of *Ficus carica* leaves. *Pharmaceutical Biology*, **43**(8), 683-686.
- Lavilla, I., Bendicho, C. (2017) Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. U: Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development, (Dominguez González, H., Gonzáles Muñoz, M. J., ured.), Elsevier, Nizozemska, str. 291-316.
- Liang, X., Fan, Q. (2013) Application of Sub-Critical Water Extraction in Pharmaceutical Industry. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, **1**, 1-6.
- Lodhi, F., Bradley, M. V., Crane, J. C. (1969) Auxins and gibberellin-like substances in parthenocarpic and non-parthenocarpic syconia of *Ficus carica* L., cv. King. *Plant Physiology*, **44**, 555–561.
- Madej, K. (2009) Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, **28**(4), 436-446.
- Madkour, L. H. (2020) Heavy metals and free radical-induced cell death mechanisms. U: Reactive oxygen (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanism, (Madkour, L. H., ured.), Academic Press, str. 131-157.
- Manousi, N., Sarakatsianos, I., Samanidou, V. (2019) Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants. U: Engineering Tools in Beverage Industry, volume 3, (Grumezescu, A. M., Holban, A. M., ured.), Woodhead Publishing, UK, str. 283-314.
- Mukherjee, P. K. (2019) Extraction and Other Downstream Procedures for Evaluation of Herbal Drugs. U: Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs, Elsevier, Nizozemska, str. 195-236.
- Pande, G., Akoh, C. C. (2010) Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry*, **120**, 1067-1075.

- Pisoschi, A. M., Negulescu, G. P. (2011) Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, **1**, 1-10.
- Prgomet, Ž., Prgomet, I. (2020) Smokva (*Ficus carica* L.), 2. izd., Skink d.o.o., Rovinj.
- RafiErel, O. (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, **37**, 277-285.
- Saha, S., Singh, A. K., Keshari, A. K., Raj, V., Rai, A., Maity, S. (2018) Modern extraction techniques for drugs and medicinal agents. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*, (Grumezescu, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, UK, str. 65-106.
- Sinha, K. K. (2003) Figs. U: *Encyclopedia of food science and nutrition*, (Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., ured.), 2. izd., Academic Press, San Diego, str. 2394-2399.
- Solana, R. R., Romano, A. (2020) Chemical and biological characteristic of *Ficus carica* L. Fruits, leaves, and derivatives (wine, spirit, and liqueur), U: *Modern Fruit Industry*, (Kahramanoglu, I., ured.), IntechOpen, str. 109-127.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, **579**, 200-213.
- Suliman, S., Yagi, S., Elbashir, A. A., Mohammed, I., Hussein, A., Ak, G., Zengin, G., Orlando, G., Ferrante, C. (2021) Phenolic profile, enzyme inhibition and antioxidant activities and bioinformatics analysis of leaf and stem bark of *Ficus sycomorus* L. *Process Biochemistry*, **101**, 169-178.
- Veberic, R., Colaric, M., Stampar, F. (2008) Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry*, **106**, 153-157.
- Veberic, R., Mikulic-Petkovsek, M. (2016) Phytochemical composition of Common fig (*Ficus carica* L.) cultivars. U: *Nutritional composition of fruit cultivars*, (Simmonds, M. S. J., Preedy, V. R., ured.), Academic Press, UK, str. 235-255.
- Walker, T. H., Patel, P., Cantrell, K. (2007) Supercritical fluid extraction and other technologies for extraction of high-value food processing co-products. U: *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing*, (Waldron, K., ured.), Woodhead Publishing, UK, str. 217-257.

Wang, T., Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, P., Guo, N., Niu, L. L., Fu, Y. J. (2017) Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **145**, 339-345.

Xue, H., Xu, H., Wang, X., Shen, L., Liu, H., Liu, C., Qin, Q., Zheng, X., Li, Q. (2018) Effects of microwave power on extraction kinetic of anthocyanin from blueberry powder considering absorption of microwave energy. *Journal of Food Quality*, **2018**, 1-13.

Zhou, L., Elias, R. J. (2013) Understanding antioxidant and prooxidant mechanism of phenolics in food lipids. U: Lipid Oxidation, (Logan, A., Nienaber, U., Pan, X., ured.), AOCS Press, str. 297-321.

Zulueta, A., Esteve, M. J., Frígola, A. (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, **114**, 310-316.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, reading "Doroteja Hruja". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath it.

ime i prezime studenta