

# Utjecaj uvjeta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva iz kore banane

---

Šuto, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:961135>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Marija Šuto

**UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE  
POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM NA  
IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA KORE  
BANANE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivone Elez Garofulić te uz pomoć dr. sc. Erike Dobroslavić.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić na ugodnoj suradnji, pristupačnosti, ažurnosti i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada. Također, zahvaljujem dr. sc. Eriki Dobroslavić na dostupnosti, savjetima i pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada. Posebno zahvaljujem svim prijateljima i cimericama koji su studentske dane učinili nezaboravnim.*

*Na svemu hvala Roku, bratu Anti i sestrama Katji, Luciji i Elli, babi i didu koji ovu diplomu nije dočekao i cijeloj obitelji koja me gurala naprijed.*

*Najveće hvala mojim roditeljima na strpljenju i bezrezervnoj podršci.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

### UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM NA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA IZ KORE BANANE

Marija Šuto, univ. bacc. nutr.  
0058213782

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne parametre ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) za izolaciju fenolnih spojeva iz kore banane (*Musa spp.*) te odrediti antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Ekstrakcija je provedena uz 30 %-tni etanol kao otapalo te su ispitani utjecaji omjera mase uzorka i volumena otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), amplitude ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Maseni udjeli izoliranih spojeva određeni su spektrofotometrijski, a dobivene prosječne vrijednosti iznosile su za hidrokisicimne kiseline 140,02 mg CAE/100 g i flavonoide 58,35 mg QE/100 g. Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 5,09 mmol TE/100 g i ABTS metodom 5,44 mmol TE/100 g. Najveći udjeli ukupnih hidrokisicimnih kiselina i flavonoida te antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom dobiveni su pri parametrima 1:60 g/mL/100 %/15 min koji su time utvrđeni kao optimalni uvjeti UAE za koru banane, dok je ABTS metoda pokazala drugačiji trend s optimalnim uvjetima 1:60 g/mL/ 75 %/ 10 min.

**Ključne riječi:** kora banane, UAE, hidrokisicimne kiseline, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 47 stranica, 5 slika, 5 tablica, 66 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Erika Dobrosravić

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Repajić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 23. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

THE INFLUENCE OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION PARAMETERS ON THE ISOLATION OF THE PHENOLIC BANANA PEEL COMPOUNDS

Marija Šuto, univ. bacc. nutr.  
0058213782

**Abstract:** The aim of this study was to determine the optimal parameters of ultrasound-assisted extraction (UAE) for the isolation of phenolic compounds from banana peel (*Musa spp.*) and to determine the antioxidant activity of the extracts. The extraction was carried out with 30% ethanol as a solvent and the effects of the ratio of sample mass to solvent (1:40, 1:50 and 1:60 g/mL), ultrasound amplitude (50, 75 and 100%) and extraction time (5, 10 and 15 min) were examined. The mass fractions of the isolated compounds were determined spectrophotometrically and the average values obtained for hydroxycinnamic acids were 140.02 mg CAE/100 g and flavonoids 58.35 mg QE/100 g. The antioxidant activity was determined by the FRAP method with an average value of 5.09 mmol TE/100 g and by the ABTS method 5.44 mmol TE/100 g. The highest yield of total hydroxycinnamic acids and flavonoids and the antioxidant activity determined by the FRAP method were obtained at parameters 1:60 g/mL/100%/15 min, which were determined as the optimal UAE conditions for banana peel, while the ABTS method showed a different trend with optimal parameters 1:60 g/mL/ 75%/ 10 min.

**Keywords:** banana peel, UAE, hydroxycinnamic acids, flavonoids, antioxidant activity

**Thesis contains:** 47 pages, 5 figures, 5 tables, 66 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Erika Dobrosravić, PhD

**Reviewers:**

1. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja Repajić, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra Albino, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 23<sup>rd</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. BANANA (<i>MUSA SPP.</i>)</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. NUSPROIZVODI BANANE</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. List.....	3
2.2.2. Kora.....	4
<b>2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI KORE BANANE</b> .....	<b>5</b>
2.3.1. Fenolni spojevi .....	5
<b>2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA KORE BANANE</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5. METODE IZOLACIJE FENOLNIH SPOJEVA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM</b> .....	<b>12</b>
2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost UAE .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>16</b>
3.1.1. Uzorak.....	16
3.1.2. Kemikalije i standardi .....	16
3.1.2. Aparatura i pribor .....	18
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	<b>19</b>
3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz kore banane primjenom UAE .....	19
3.2.2. Određivanje ukupnih hidrosicimetnih kiselina .....	21
3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida .....	22
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	23
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	24
3.2.6. Statistička obrada rezultata.....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. UTJECAJ UAE NA UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOIDA KORE BANANE</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. UTJECAJ UAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST SPOJEVA KORE BANANE</b> .....	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>39</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>40</b>



## 1. UVOD

Banana (*Musa spp.*) predstavlja jednu od najvažnijih i najprodavanijih voćnih kultura koju karakterizira žuti jestivi plod te se većinski uzgaja u tropskom pojasu. Tijekom berbe i konzumacije plodova nastaje velika količina nusproizvoda među koje se ubrajaju pseudostabljika, lišće i kora. Banana sadrži brojne bioaktivne spojeve poput fenola, karotenoida i fitosterola čija je zastupljenost u prehrani poželjna zbog antioksidativnog djelovanja i zaštite organizma od oksidativnog stresa. Kora banane također sadrži bioaktivne spojeve uključujući flavonoide, tanine, glikozide, alkaloida, antocijanine i terpenoide koji pružaju antibakterijski, protuupalni i antihipertenzivni učinak te se tradicionalno koristila kao ljekovito sredstvo za liječenje raznih bolesti poput opekline, anemije, proljeva, čireva i upala. Istraživanja su pokazala kako fenolni spojevi kore banane posjeduju snažna antioksidativna i antimikrobna svojstva te su povezani s raznim zdravstvenim benefitima.

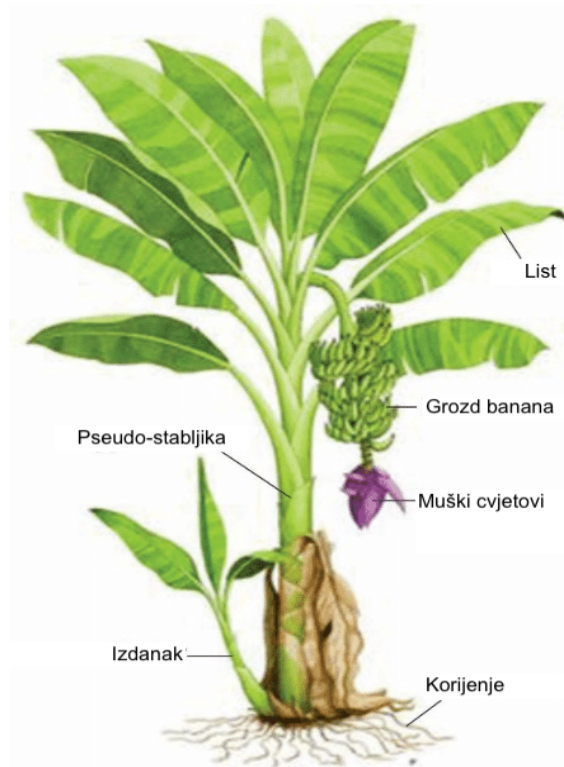
Izolacija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala može se provesti konvencionalnim ili nekonvencionalnim metodama ekstrakcije. U ovom radu izolacija fenolnih spojeva provedena je ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom koja pripada nekonvencionalnim metodama koje karakterizira kraće vrijeme ekstrakcije, jednostavnost izvođenja, smanjena vjerojatnost termičke razgradnje i ekološka prihvatljivost. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom djeluje preko mehanizma kavitacije, odnosno generira se kompresija i ekspanzija matriksa uzrokujući permeabilizaciju stanične stijenke i povećani prinos ekstrakcije željenih spojeva.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva (ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonoida) iz kore banane i odrediti antioksidacijsku aktivnost ekstrakata prilikom čega se kao ekstrakcijsko otapalo koristio 30 %-tni etanol. Promatrani parametri ekstrakcije uključivali su omjer mase uzorka i volumena otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), amplitudu ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Antioksidacijska aktivnost određena je primjenom FRAP i ABTS metoda, a maseni udjeli fenolnih spojeva određeni su spektrofotometrijski.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BANANA (*Musa spp.*)

Banana je jestivo voće i zeljasta, višegodišnja biljka koja pripada rodu *Musa* i obitelji *Musaceae*. Jestivim bananama može se dati jedno znanstveno ime, tj. *Musa spp.*, budući da se plodovi razlikuju samo po ploidnosti (Pereira i Maraschin, 2015). Svi jestivi plodovi banane su partenokarpni, ne sadrže sjemenke te pripadaju dvjema glavnim vrstama; *Musa acuminata* Colla i *Musa balbisiana* Colla, a hibrid ove dvije vrste čini *Musa x paradisiaca* L. (Sidhu i Zafar, 2018). Desertne banane i plantane sustavno su prema broju kromosoma klasificirane u četiri skupine: *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* i *Callimusa* (Pereira i Maraschin, 2015).



**Slika 1.** Ilustracija banane (prema Alzate Acevedo i sur., 2021)

Banane se uzgajaju u vlažnim, tropskim i subtropskim područjima Amerike, Afrike i Azije gdje svaka predstavlja oko trećinu proizvodnje, protežući se do Europe (Kanarski otoci) i Australije (Queensland). U svijetu je priznato više od tisuću kultivara ili domaćih sorti banana (Heslop-Harrison i Schwarzacher, 2007). Ovisno o sorti i uvjetima uzgoja, visina biljke može varirati od 3 do 7 m, a listovi su veliki, savitljivi, vodootporni i veličine oko 2,7 × 0,6 m (Kora, 2019).

Morfološke karakteristike biljke prikazane su na slici 1. Pseudostabljika i listovi odumiru nakon što banana urodi plodom kako bi napravili mjesta mladoj biljci (izdanku) da izraste iz rizoma. Nakon berbe plodova, na plantažama se vrši dekapitacija cijele biljke kako bi mladi izdanci mogli zamijeniti matičnu biljku te se taj ciklus može nastaviti generacijama (Padam i sur., 2014). Od sadnje banane do berbe grozdova koji mogu sadržavati od 100 do 400 plodova treba proći između 8 i 13 mjeseci. Optimalan rok berbe, odnosno razmak između cvatnje i berbe, određuje se prema cvatnji, sorti i klimatskoj zoni, a u obzir se uzima i veličina ploda. Plodovi banane su klimakterici, tj. prijelaz od završetka razvoja do konzumacije proizvoda u svježem stanju praćen je intenzivnom respiratornom aktivnošću i stvaranjem etilena (Aurore i sur., 2019). Grozdovi banane mogu se brati kada je plod zrele zelene boje, a kasnije zeleni plodovi umjetno dozrijevaju u komori s kontroliranom atmosferom ili u prirodnim uvjetima pri sobnoj temperaturi (Qamar i Shaikh, 2018). Soltani i sur. (2011) definirali su sedam faza sazrijevanja banane na temelju boje kore. Stupanj 1 predstavlja potpuno zelenu bananu, stupanj 2 zelenu koru s tragovima žute boje, stupanj 3 je više zelen nego žut, stupanj 4 više je žut nego zelen, stupanj 5 karakterizira žuta kora s tragovima zelene boje, stupanj 6 predstavlja potpuno žuta kora, a stupanj 7 označava žutu koru sa smeđim mrljama i točkicama.

Jestivi dio banane na 100 g sadrži oko 89,0 kcal energije, 1,1 g proteina, 1 mg natrija, 8 mg kalcija, 385 mg kalija, 121,8 g ugljikohidrata, 0,40 mg željeza, 30 mg magnezija, 0,11 mg bakra, 11,7 mg vitamina C, 610 µg niacina, 40 µg tiamina (vitamin B1) i 23,0 µg folne kiseline (Aurore i sur., 2009).

## **2.2. NUSPROIZVODI BANANE**

Nusproizvodi banane uključuju pseudostabljiku, lišće, cvat, peteljku ploda, rizom i koru. Većina tih nusproizvoda je podcijenjena roba s ograničenom komercijalnom vrijednošću i primjenom te se smatra poljoprivrednim otpadom. Pseudostabljike i lišće obično se ostavljaju da trunu na plantažama kako bi se nadoknadile hranjive tvari u tlu, a ponekad se listovi koriste kao materijali za omatanje tradicionalne hrane u jugoistočnoj Aziji međutim njihova je primjena ograničena samo na neke etničke namirnice (Padam i sur., 2014).

### **2.2.1. List**

Pseudostabljika i list banane mogu se koristiti kao resursi za gnojidbu, stočnu hranu, energiju i vlakna, pročišćavanje otpadnih voda, biognojiva, tekstil, papir i kompozite te su bogate karotenom, nikotinskom kiselinom, riboflavinom, tiaminom i drugim vitaminima što ih čini izvorom poljoprivrednog otpada s integriranim profilom hranjivih tvari (Zou i sur., 2022). Bogat

su izvor i polifenola, flavonoida, vlakana, ugljikohidrata, tanina, vitamina C, enzima i kalija (Kora, 2019). U Indiji se listovi banane tradicionalno koriste kao tanjuri za jelo, sadrže obilje polifenola koji djeluju kao antioksidansi i pomažu u probavi hrane ispuštanjem vitamina C i kalija tijekom posluživanja tople hrane. Velika površina lista pogodna je za posluživanje više slijedova jela, a listovi su otporni na vodu i curenje, nemaju zaostatke deterdženata kao klasično posuđe i daju specifičan okus i miris nakon posluživanja tople hrane (Kora, 2019). Meenashree i sur. (2014) evaluirali su ukupne fenole i antimikrobnu aktivnost ekstrakata svježeg lista banane *M. acuminata* te su utvrdili kako je ukupni prinos fenola najveći u petroleteru odnosno 12,19 mg/mL, a zatim u acetonu i etanolu. Ova je studija pokazala kako je list banane dobar izvor fenolnih spojeva, a osim toga, sva tri ekstrakta pokazala su izvrsnu antifungalnu aktivnost protiv dvije patogene gljivice *Aspergillus terreus* i *Penicillium solitum*, ali nisu pokazala nikakvu antibakterijsku aktivnost protiv *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Istraživanje koje su proveli Sivasamugham i sur. (2021) prikazalo je kako su 80 %-tni etanolni ekstrakti lista *M. paradisiaca* i *M. acuminata* pokazali slične inhibitorne učinke koji su usporedivi s antibiotikom klindamicinom, dok list *M. sapientum* nije pokazao nikakvu inhibicijsku zonu protiv izolata MRSA (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*) unatoč istom sadržaju fitokemikalija. Chendake i sur. (2021) preporučuju redovitu upotrebu listova banane (*M. paradisiaca*) u kirurškim jedinicama zbog izvrsnih svojstava obloga kod kontuziranih, razderanih i šivanih rana na području glave, vrata i lica. Statistička analiza podataka provedene studije pokazala je kako su svojstva listova banane i obloga od vazelina paralelna u svim aspektima, osim boli pri promjeni obloga koja je bila manja kod obloga od lišća banane i imala je statistički značajnu vrijednost ( $p < 0,001$ ).

### 2.2.2. Kora

Godišnje se proizvede velika količina banana, a njihova kora, koja čini oko trećinu mase ploda, uglavnom se baca kao otpad. Tradicionalno se koristila za liječenje raznih bolesti poput opekline, proljeva, kašlja i čireva, a u Brazilu se primjenjivala za pospješivanje zacjeljivanja rana uzrokovanih opeklinama i za izradu obloga koji se omataju oko ozljede kako bi se smanjila bol i oteklina (Pereira i Maraschin, 2015). Kora se koristila za prevladavanje ili prevenciju niza drugih bolesti i zdravstvenih stanja koja uključuju depresiju (povezana sa sadržajem triptofana banane), anemiju (visok sadržaj željeza u kori potiče proizvodnju hemoglobina) i krvni tlak (visok udio kalija i nizak udio soli). Bogat je izvor fruktooligosaharida, prebiotika koji hrane prirodnu mikrofloru debelog crijeva, koja proizvodi vitamine i probavne enzime čime se poboljšava sposobnost adsorpcije hranjivih tvari u ljudskom organizmu (Vu i sur., 2018). Hassan i sur. (2018) utvrdili su da kora banane sadrži  $1,95 \pm 0,14$  % sirovih bjelančevina, 5,93

$\pm 0,13$  % sirovih masti,  $8,37 \pm 0,18$  % sirovih vlakana i  $11,82 \pm 2,17$  % ugljikohidrata. Također je bogata kalcijem, fosforom, magnezijem i željezom te predstavlja potencijalno dobar izvor hranjivih tvari za proizvodnju stočne hrane. Kora banane koristi se i kao sastojak u kuhanju, pročišćavanju vode, proizvodnji mnogih biokemijskih proizvoda i anorganskog otpada, a nutritivna joj vrijednost varira ovisno o kultivaru i stupnju zrelosti (Hikal i sur., 2022).

Prema novijoj literaturi, dobar je izvor višestruko nezasićenih masnih kiselina uključujući linolensku i linolnu kiselinu, a prehrana bogata linolnom kiselinom pokazala je smanjenu masnoću jetre i blago poboljšan metabolički status bez ikakvih znakova upale. Kora banane dobar je izvor dijetalnih vlakana, a dvije primarne komponente ukupnih vlakana čine topljiva (fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi) i netopljiva dijetalna vlakna (celuloza, lignin i određene hemiceluloze). Zastupljenost netopljivih i topljivih vlakana kretala se od 5,91- 44,95 % odnosno 0,23- 7,75 % što ukazuje da su netopljiva vlakna zastupljenija komponenta ukupnih vlakana izdvojenih iz kore banane (Zou i sur., 2022). Kora banane može se smatrati dobrim izvorom aminokiselina, jer je većina od 18 aminokiselina prisutna u različitim stadijima razvoja. Kora sadrži triterpene i sterole kao što su stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, kampesterol, 24-metilen cikloartenol i cikloartenol i razne amine uključujući serotonin, tiramin, dopamin, norepinefrin i serotonin (Qamar i Shaik, 2018). Također posjeduje antimikrobna svojstva koja su učinkovita protiv *S. aureus*, *B. subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* i *E. coli* (Zaini i sur., 2022).

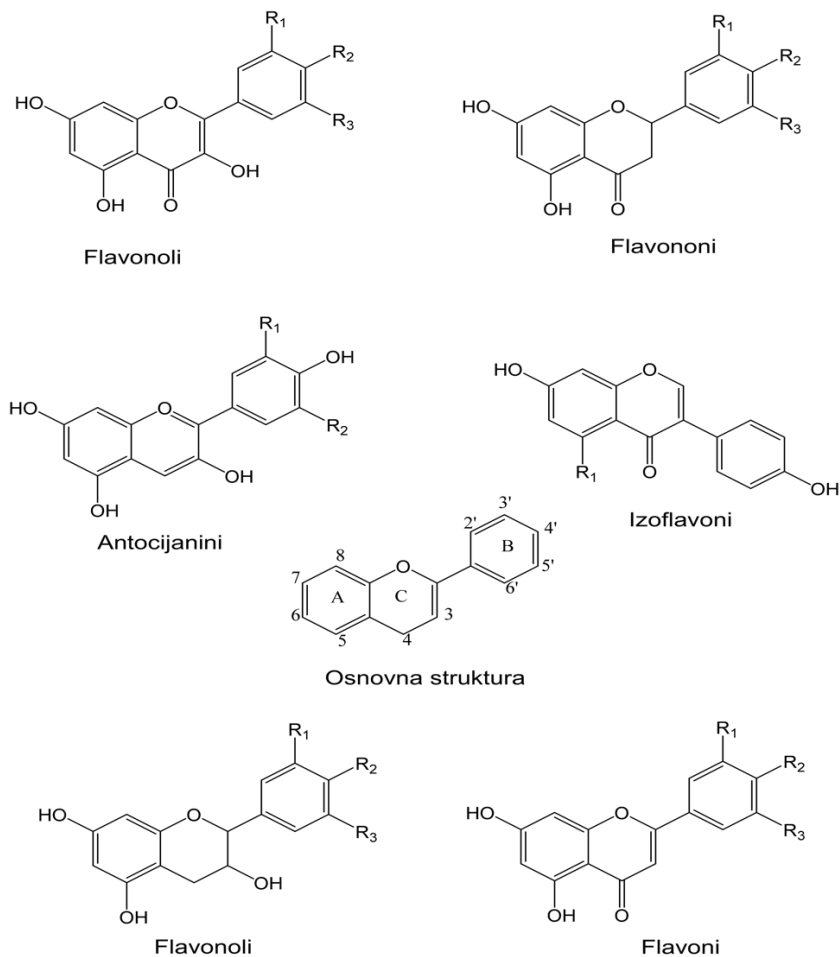
Među korama voća koje uključuju avokado, ananas, papaju, dinju i marakuju, kora banane sadrži drugu najveću razinu ukupnih fenola. Sadrži bioaktivne spojeve kao što su flavonoidi, tanini, alkaloidi, glikozidi, antocijanini i terpenoidi koji pružaju antidijabetički, antibakterijski, protuupalni i antihipertenzivni učinak. Ovaj nusproizvod bogat je fenolima među kojima je više od 40 identificiranih pojedinačnih spojeva. Međutim, na sastav i razine spojeva može utjecati širok raspon čimbenika uključujući uvjete uzgoja, sorte, zrelost i predtretmane (Vu i sur., 2018).

## **2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI KORE BANANE**

### **2.3.1. Fenolni spojevi**

Fenoli su najčešći sekundarni biljni metaboliti koji obuhvaćaju više od 8000 poznatih struktura, a označavaju skupinu spojeva s jednim aromatskim prstenom ili više njih koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina (Alara i sur., 2021). Dijelimo ih na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, kumarine i tanine (Liu, 2013). Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve kiseline (C6–C1) u koje se ubrajaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska i elaginska kiselina te na hidroksicimetne kiseline (C6–C3) kojima pripadaju *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska i klorogenska kiselina.

Flavonoidi se sastoje od tri prstenaste strukture u C6–C3–C6 obliku što je prikazano na slici 2 te se u tu skupinu ubrajaju flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavan-3-oli i antocijanidini. Do danas je poznato oko 1300 kumarina. U stilbene spada resveratrol, a tanini se dijele na hidrolizirajuće tanine poput elagitanina i nehidrolizirane, kondenzirane tanine poznatije kao proantocijanidine, koji su polimeri katehina i epikatehina (Shahidi i Yeo, 2016).



**Slika 2.** Opće strukture glavnih skupina flavonoida (prema Rahman i sur., 2021)

Fenolni spojevi igraju važne uloge u reprodukciji, rastu i metabolizmu biljaka i djeluju kao obrambeni mehanizmi protiv patoloških virusnih i gljivičnih infekcija. Odgovorni su za zaštitu biljaka od sunčeve svjetlosti i smanjenje oksidativnog stresa tako što apsorbiraju štetne valne duljine visoke energije na dijelovima bogatim elektronima odnosno  $\pi$ -vezi aromatskih prstenova. Također, štite biljke od predatora, kukaca i insekata svojim mogućim toksičnim djelovanjem ili taloženjem proteina čime dovode do učinka nabiranja u ustima, a mogu igrati ulogu i u simbiozi tako što služe kao sredstvo za privlačenje oprašivača. Osim svojih funkcija u biljkama, prehrana bogata fenolnim spojevima može smanjiti rizik od nastanka kroničnih bolesti poput raka, bolesti srca i dijabetesa (Shahidi i Yeo, 2016; Liu, 2013).

Polifenoli u hrani mogu utjecati na gorčinu, trpkost, boju, okus, miris i oksidacijsku stabilnost hrane, a pokazali su i protuupalna svojstva kod liječenja kožnih bolesti, reumatoidnog artritisa i upalne bolesti crijeva (Rahman i sur., 2021). Banana se smatra bogatim izvorom raznih bioaktivnih spojeva kao što su fenoli, karotenoidi, glikozidi, alkaloidi, tanini, terpenoidi, saponini, steroidi, biogeni amini i fitosteroli (Pereira i Maraschin, 2015). Fenolni spojevi koje su u banani identificirali Sidhu i Zafar (2018) uključuju galnu, *p*-hidroksibenzojevu, ferulinsku, sinapinsku, *p*-kumarinsku, siringinsku i vanilinsku kiselinu.

HPLC-PDA-ESI-MS (engl. *high pressure liquid chromatography-photodiode array-electrospray ionization-mass spectrometry*) analiza ekstrakata kore banane u istraživanju koje su proveli Manthey i Jaitrong (2016) identificirala je četiri glavne klase polifenola, uključujući flavonolne glikozide (kvercetin, miricetin, metilmiricetin i kamferol), dva odvojena skupa hidroksicinamata (*p*-kumarinska i ferulinska kiselina) i proantocijanidine (katehin).

U istraživanju koje su proveli Zhang i sur. (2019) ekstrakcijom je dobiveno je 28,61 g praha polifenolnog ekstrakta iz kore banane, a ukupni sadržaj fenola u prahu ekstrakta iznosio je  $23,33 \pm 1,59$  ekvivalenta galne kiseline (GAE) mg/g praha. Prinos sadržaja polifenola iz kore banane iznosio je 0,67 %. Pomoću LC-TOF-MS/MS (engl. *liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry*) analize određen je kemijski sastav ekstrakta te su detektirani 3,4-dihidroksibenzaldehid, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, epikatehin, rutin, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina, miricetin i galna kiselina.

Rebello i sur. (2014) promatrali su fenolne spojeve brašna kore banane. Ekstrakti brašna pokazali su visok ukupni sadržaj fenola, oko 29 mg/g GAE, uslijed prisutnosti flavonoida odnosno visoko polimeriziranih prodelfinidina (oko 3952 mg/kg ekvivalenta (+)-katehina), praćenih nižim sadržajem flavonolnih glikozida (3-rutinozidi i strukture na bazi kvercetina, oko 129 mg/kg) te dimera procijanidina tipa B (B1, B2 i B4) i monomernih flavan-3-ola ((+)-katehin, (-)-epikatehin i (-)-galokatehin) koji su zajedno pridonosili s oko 126 mg/kg ekvivalenta (+)-katehina.

Chueh i sur. (2019) odredili su sadržaj ukupnih fenola u prahu kore banane u iznosu od 872,7 mg GAE/100 g suhe tvari (s.t.). Sadržaj galokatehina iznosio je 91,9 mg/100g s.t., epigalokatehina 65,9 mg/100 g s.t. i epigalokatehin galata 10,3 mg/100 g s.t..

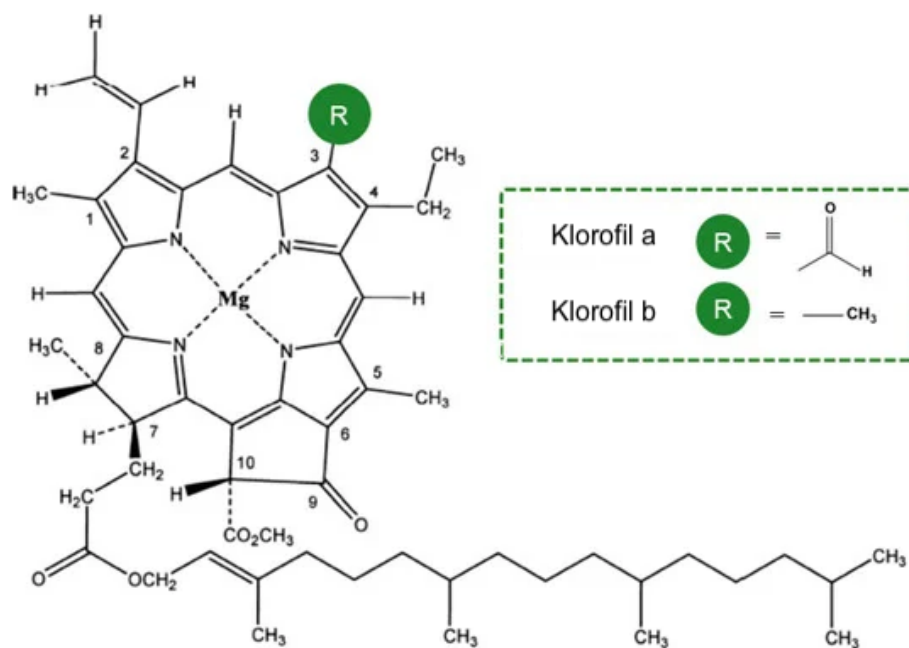
U istraživanju koje su proveli Vu i sur. (2019) sadržaj fenola se povećavao kako je banana sazrijevala, a zatim se lagano smanjio kada je voće postalo prezrelo te su se ukupni fenoli kretali od 30 do 46 mg GAE/g s.t. bilo zelene ili zrele kore banane.

Aboul-Enein i sur. (2016) identificirali su fenolne spojeve u kori banane te proučavali učinkovitost različitih otapala na njihovu ekstrakciju. Metanolni ekstrakt (80 %) imao je najveći udio ukupnih fenola u iznosu od 17,89 mg GAE/g s.t., flavonoida 21,04 mg ekvivalenta kvercetina/g s.t. i tanina 24,21 mg(ekvivalenta taninske kiseline)/g s.t. Nadalje, u acetonskom

ekstraktu kore banane primjenom HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) metode identificirani su krizin, kvercetin, katehin, kafeinska kiselina, cimetna kiselina i kumarin.

### 2.3.2. Pigmenti

Klorofil predstavlja složeni zeleni pigment koji se nalazi u biljkama, algama i određenim bakterijama, a u procesu fotosinteze ima bitnu ulogu apsorpcije svjetlosne energiju koju pretvara u kemijsku. Molekula klorofila sastavljena je od porfirinskog prstena, magnezijevog iona i pričvršćenog ugljikovodičnog repa što je vidljivo na slici 3. Porfirinski prsten apsorbira svjetlosnu energiju, a magnezijev ion djeluje kao akceptor elektrona. Klorofil ima mnogo oblika, a najpoznatiji su klorofil *a* i klorofil *b*. Klorofil *a* najučinkovitije apsorbira svjetlost u crvenom i plavom dijelu spektra, s vršnom apsorpcijom na oko 430 odnosno 662 nm. Kemijskom strukturom klorofil *b* sličan je klorofilu *a*, ali ima nešto drugačiji porfirinski prsten što rezultira time da klorofil *b* apsorbira svjetlost u plavo-zelenom području spektra, s vršnom apsorpcijom na oko 453 nm. Klorofil se razgrađuje na različite pigmente; feofitin odnosno oblik klorofila kojem nedostaje magnezijev ion i feoforbid (Martins i sur., 2023).

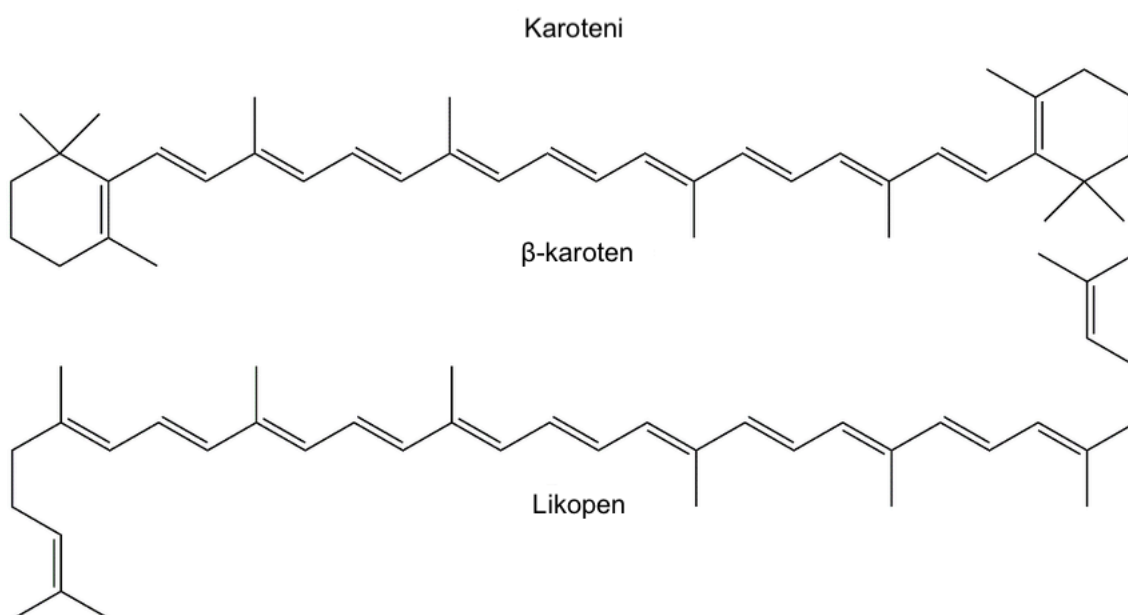


**Slika 3.** Kemijska struktura klorofila *a* i klorofila *b* (prema Martins i sur., 2023)

Do danas je u prirodi otkriveno više od 850 karotenoida, a više od 250 ih je morskog podrijetla (Genç i sur., 2020). Karotenoidi predstavljaju podrazred izoprenoidnih metabolita koji se proizvode u svim fotosintetskim biljkama, algama i cijanobakterijama. Svi se karotenoidi sastoje od polienskog lanca s konjugiranim dvostrukim vezama i mogu se podijeliti na karotene i ksantofile, pri čemu prvi nemaju, a drugi sadrže atome kisika kao što su hidroksi, karbonil,



aldehid, karboksilna, epoksidna i furanoksidna skupina u svojim molekulama ugljikovodika. Apsorbiraju vidljivu svjetlost, a zbog svoje strukture, karotenoidi daju boju, odnosno stvaraju pigmente jarko žute, narančaste i crvene boje s različitim intenzitetom u povrću, voću i cvijeću (Hermanns i sur., 2020). Skupini karotena pripadaju  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten i likopen (slika 4). U ksantofile se ubrajaju  $\beta$ -kriptoksantin, lutein, zeaksantin, astaksantin, fukoksantin i peridin (Maoka, 2020). Poznato je da  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin, ali ne i likopen, imaju aktivnost provitamina A (Pereira i Maraschin, 2015). Igraju značajnu ulogu u zdravlju očiju, kostiju i kardiovaskularnog sustava, a lutein i zeaksantin štite ljudsko oko apsorbirajući plavu i blisku UV svjetlost (Genç i sur., 2020).



**Slika 4.** Kemijska struktura  $\beta$ -karotena i likopena (prema Genç i sur., 2020)

Dozrijevanje banana lako je prepoznatljivo po karakterističnoj promjeni njihove boje od tamno zelene do žute, a njihovu prezrelost i eventualno truljenje prati pojava smeđe boje i točkica. Vu i sur. (2019) pratili su promjene fitokemikalija i antioksidativnog kapaciteta kore banane tijekom procesa sazrijevanja; sa i bez tretmana etilenom. Utvrdili su da se klorofil razgradio za približno 90 %, dok su karotenoidi porasli za otprilike 50 %, a flavonoidi za 27 % kako je banana mijenjala boju. Za sve tretmane s ili bez etilena, ukupni klorofili postupno su se smanjivali od stupnja 1 do stupnja 2 sazrijevanja banane, u stupnju 4 su se dramatično smanjili, do blagog smanjivanja je došlo kod stupnja 5, a konačno su ostali stabilni u stupnjevima 6 i 7. Klorofili u prirodno zrelim bananama snizili su se s 291  $\mu\text{g/g}$  s.t. u stupnju 1 do 30  $\mu\text{g/g}$  s.t. u stupnju 4, a zatim su bili između 13-20  $\mu\text{g/g}$  s.t. kada je voće doseglo potpuno zrelo i prezrelo stanje. Karotenoidi su se povećavali kako se kora mijenjala iz zelene u žutu, a u prirodnom

sazrijevanju i prvom stupnju, zelena banana sadržavala je 64 µg karotenoida u 1 g kore (s.t.). Taj se broj povećao za otprilike 50 % kako je banana dosegla stupnjeve 3 i 4. Yan i sur. (2016) procijenjivali su varijacije sadržaja karotenoida u kori banane tijekom faza sazrijevanja i određivali najbolje otapalo za ekstrakciju karotenoida za primjenu u hrani. Stupanj zrelosti banane 5 sadržavao je najveći sadržaj ukupnih karotena odnosno 1,86 µg/g svježe kore banane. Iz jednog grama kore banane ekstrahirano je 0,57 µg ksantofila i 0,84 µg beta-karotena kombinacijom otapala heksan–dietil eter–aceton i heksan–dietileter.

## 2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA KORE BANANE

Antioksidans je molekula koja inhibira oksidaciju drugih molekula, a oksidacija označava kemijsku reakciju koja prenosi elektron ili vodik s tvari na oksidacijsko sredstvo. Reakcije oksidacije mogu proizvesti slobodne radikale koji mogu pokrenuti lančane reakcije i uzrokovati oštećenje ili smrt stanice. Antioksidansi prekidaju ove lančane reakcije uklanjanjem intermedijera slobodnih radikala i inhibiraju druge oksidativne reakcije (Moharram i Youseff, 2014). Slobodni radikali su molekularni fragmenti ili molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj valentnoj ljusci, vrlo su reaktivni, mnogi od njih su nestabilni i stoga ili pričvršćuju elektrone s drugih molekula ili doniraju svoje nesparene elektrone. Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) uključuju ne samo slobodne radikale (superoksidni anionski radikal  $O_2^{\bullet-}$ , hidroksilni radikal  $\bullet OH$ , hidroperoksidni radikal  $HO_2^{\bullet}$ , peroksilni radikal  $ROO^{\bullet}$ ), već i oksidante, kao što su singletni kisik  $1O_2$ , vodikov peroksid  $H_2O_2$  i hipoklorna kiselina  $HOCl$ . Reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) uključuju: nitrozilni anion  $NO^-$ , nitrilni kation  $NO_2^+$ , peroksinitrit  $ONOO^-$ , dušikov oksid  $\bullet NO$  i dušikov dioksid  $\bullet NO_2$  (Parcheta i sur., 2021). Prema funkciji antioksidansi se mogu rasčlaniti na primarne i sekundarne. Primarne antioksidanse čine antioksidansi koji prekidaju lanac, reagiraju s lipidnim radikalima i pretvaraju ih u stabilnije produkte. Ovoj skupini pripadaju fenoli i uključuju antioksidativne minerale, vitamine, flavonoide, katehine, karotenoide,  $\beta$ -karoten, likopen i diterpene. Začini također pripadaju primarnim antioksidansima zbog obilja fitokemikalija koje sadrže te uključuju crni papar, majčinu dušicu, češnjak, kumin i njihove derivate. Sekundarnim antioksidansima pripadaju fenolni spojevi koji imaju funkciju hvatanja slobodnih radikala i zaustavljanja lančanih reakcija. Spojevi uključuju: butil hidroksianisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT) i propil galat (PG) (Moharram i Youseff, 2014).

Antioksidansi se mogu podijeliti i na neenzimatske i enzimatske. I neenzimski (npr. mokraćna kiselina, reducirani glutation, bilirubin, transferin, koenzim Q10, lipoična kiselina i nutritivni antioksidansi kao što su vitamini A, C, E i njihovi derivati, flavonoidi, karotenoidi, minerali, omega-6 i omega-3 masne kiseline) i enzimski antioksidansi (kao što su katalaza,

superoksid dismutaza i glutation peroksidaza) sprječavaju i popravljaju oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim i dušikovim vrstama, smanjuju rizik od degenerativnih bolesti i jačaju imunološki sustav (Parcheta i sur., 2021; Moharram i Youseff, 2014).

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata i komponenti kore banane procjenjuje se korištenjem antioksidativnih testova. Najčešći testovi koji se koriste u analizi hrane, prehrane i dodataka prehrani su DPPH (engl. *free radical diphenylpicrylhydrazyl*), FRAP (engl. *ferric reducing activity power assay*) i ABTS (engl. *2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)*) (Parcheta i sur., 2021). U ovom radu korištene su FRAP i ABTS metoda.

Vu i sur. (2019) u svom su istraživanju primjetili kako su se antioksidacijski kapacitet te razine fenola i proantocijanidina povećavale kako je banana dozrijevala, no kada je banana postala prezrela, kora je izgubila do 21 % svog antioksidacijskog kapaciteta i do 44 % svojih fitokemikalija. U istraživanju koje su proveli Rebello i sur. (2014) visok sadržaj fenola u ekstraktima brašna kore banane vjerojatno je odgovoran za visoku antioksidacijsku aktivnost koja je mjerena različitim metodama, uključujući FRAP metodu koja je iznosila oko  $14 \pm 1,7$   $\mu\text{M/g}$ ; zatim ABTS oko  $242,2 \pm 33,8$   $\mu\text{M/g}$  i ORAC (engl. *oxygen radical absorbance capacity*) oko  $435,5 \pm 60,2$   $\mu\text{M/g}$  (Trolox ekvivalenata TE/g s.t.).

Sulaiman i sur. (2011) promatrali su antioksidacijsku aktivnost osam sorti malezijskih banana (*Musa* sp.). Kod DPPH metode kloroformski ekstrakti osušenih kora sorti Mas ( $19,39 \pm 0,15$  mg TE/g s.t.) i Rastali ( $16,16 \pm 4,28$  mg TE/g s.t.) pokazali su najveću aktivnost. Kod FRAP metode, najveću aktivnost pokazao je kloroformski ekstrakt osušene kore sorte Rastali u iznosu od  $21,63 \pm 0,42$  mg TE/g s.t..

U istraživanju koje su proveli Aboul-Enein i sur. (2016) primjenom ABTS metode acetonski ekstrakt kore banane (pri najvišoj koncentraciji (100  $\mu\text{g/ml}$ )) pokazao je najveću antioksidacijsku aktivnost ( $75,39 \% \pm 0,59$ ), a slijede ga etanolni ( $28,30 \% \pm 0,85$ ), metanolni ( $27,91 \% \pm 0,83$ ) i vodeni ekstrakt ( $25,16 \% \pm 1,42$ ).

## 2.5. METODE IZOLACIJE FENOLNIH SPOJEVA

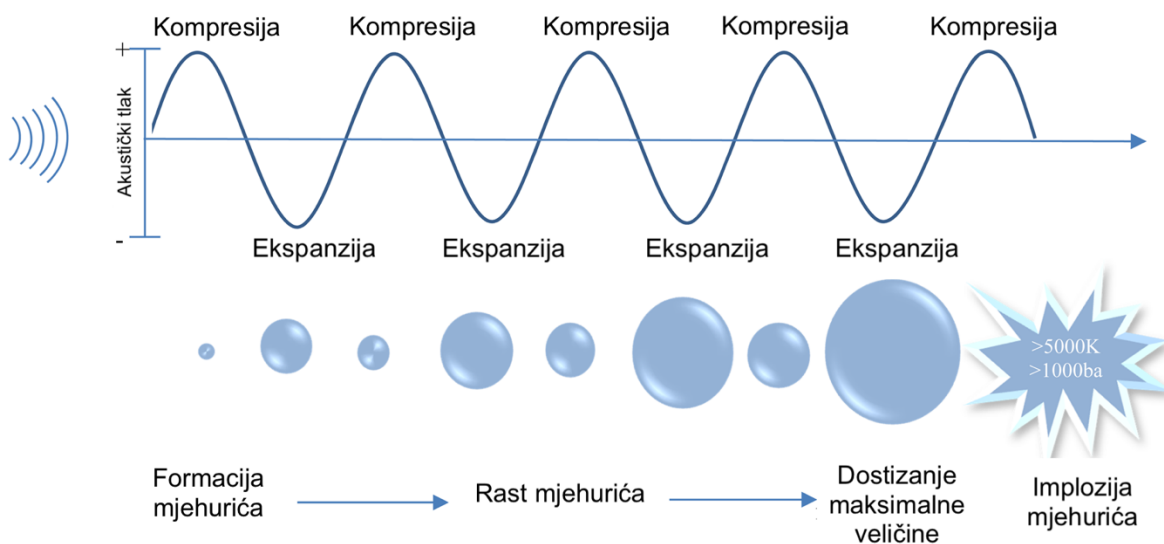
Ekstrakcija predstavlja proces odvajanja u kojem se vrši raspodjela analita između dvije faze koje se ne miješaju kako bi se dobio odgovarajući koeficijent raspodjele (Dobiáš i sur., 2010). Zbog složenosti većine uzoraka, način njihove pripreme obično ima značajan utjecaj na rezultat cjelokupnog procesa ekstrakcije. Priprema uzorka prije ekstrakcije obično uključuje sušenje, homogenizaciju, filtraciju i mljevenje (Alara i sur., 2021). Najčešće se za ekstrakciju fenola koriste otapala kao što su metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije, uključujući različite udjele vode (Garcia-Salas i sur., 2010). Nekoliko parametara

može utjecati na prinos fenola, uključujući vrijeme ekstrakcije, temperaturu, omjer otapala i uzorka, broj ponovljenih ekstrakcija uzorka kao i vrsta otapala (Khoddami i sur., 2013). Metode izolacije fenolnih spojeva dijelimo na konvencionalne (tradicionalne) i nekonvencionalne. Konvencionalne metode uključuju Soxhlet ekstrakciju, maceraciju i hidrodestilaciju. Karakterizira ih niska cijena i jednostavna upotreba, međutim niske su učinkovitosti, dugo traju i zahtjevaju velike volumene organskih otapala (Alara i sur., 2021). Temelje se na učinkovitosti ekstrakcije različitih otapala koja se koriste u tu svrhu te je pri odabiru otapala potrebno uzeti u obzir molekularni afinitet, polarnost, sigurnost za okoliš, toksičnost i ekonomsku isplativost. Glavni izazovi konvencionalne ekstrakcije su dugo vremensko trajanje, zahtjev za skupim otapalima visoke čistoće, isparavanje velike količine otapala, niska selektivnost ekstrakcije i toplinska razgradnja termolabilnih spojeva (Selvamuthukumaran i Shi, 2017). Zbog nedostataka povezanih s konvencionalnim postupcima ekstrakcije, pojavila se potražnja za nekonvencionalnim tehnikama ekstrakcije fenolnih spojeva. Upotreba ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (engl. *ultrasound-assisted extraction*, UAE), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcije superkritičnog fluida (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE), superkritične CO<sub>2</sub> ekstrakcije (engl. *supercritical CO<sub>2</sub> extraction*, SC-CO<sub>2</sub>), ekstrakcije tekućinama pri povišenom tlaku (engl. *pressurized liquid extraction*, PLE), ekstrakcije potpomognute enzimima (engl. *enzyme-assisted extraction*, EAE) i obrade pod visokim hidrostatskim tlakom (engl. *high hydrostatic pressure processing*, HHPP) raste. Ove metode skraćuju vrijeme ekstrakcije, smanjuju ispuštanje toksičnih zagađivača smanjenjem potrošnje organskih otapala i relativno su jednostavne za izvođenje (Alara i sur., 2021; Khoddami i sur., 2013). Konvencionalne tehnike također su poznate kao tehnike hladne ekstrakcije budući da je temperatura tijekom procesa ekstrakcije relativno niska i ne utječe na stabilnost ekstrahiranih spojeva (Tiwari, 2015).

## **2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM**

Ultrazvuk se uspješno koristi za ekstrakciju polifenola, karotenoida, aromatičnih komponenata i polisaharida iz biljnih matrica uključujući cijele biljke i njihove nusproizvode (Kumar i sur., 2021). Razlika između zvuka i ultrazvuka je frekvencija vala odnosno zvučni valovi se nalaze na frekvencijama ljudskog sluha od 16 Hz do 16–20 kHz, dok su frekvencije ultrazvuka iznad ljudskog sluha, ali ispod mikrovalnih frekvencija (od 20 kHz do 10 MHz) (Picó, 2013). Prema Mehta i sur. (2022) tretmani ultrazvukom variraju unutar frekvencija od 20 do 100 kHz i snage od 10 do 1000 W/cm<sup>2</sup>, a što se frekvencijskog raspona tiče mogu se kategorizirati na “power” ultrazvuk (20-100 kHz), ultrazvuk visoke frekvencije (100 kHz-1 MHz) i dijagnostički

ultrazvuk (1-10 MHz). Ultrazvučni sustav se u osnovi sastoji od generatora, pretvornika i aplikacijskog sustava, a ključna uloga generatora je transformacija električne energije u željenu izmjeničnu struju koja pokreće pretvornik, odnosno uređaj koji struju pretvara u mehaničke vibracije. Ultrazvučni pretvornici dijele se na piezoelektrične, magnetostriksijske i pretvornik pokretan tekućinom (Mehta i sur., 2022). Glavni pokretač ekstrakcijskih učinaka sonikacije je akustična kavitacija što po definiciji predstavlja fenomen stvaranja, širenja i implozivnog kolapsa mikromjehurića nastalih primjenom ultrazvuka u tekućinama. Dakle, primjenom ultrazvuka dolazi do stvaranja longitudinalnih valova u tekućem mediju koji izazivaju niz kompresija i ekspanzija što je vidljivo na slici 5. Kavitacije i mjehurići plina stvaraju se zbog promjena tlaka koje se događaju uslijed sonikacije. Nastali mjehurići imaju veću površinu tijekom ciklusa ekspanzije, što povećava difuziju plina i dovodi do širenja mjehurića. Tijekom ciklusa kompresije dosegne se kritična točka u kojoj energija UAE ne može zadržati plinsku fazu mjehurića. Tada dolazi do brze kondenzacije i oslobađa se velika količina energije uz stvaranje šok valova koji stvaraju područja vrlo visoke temperature i tlaka, dosežući do 5500°C i 50 MPa. Kavitacija može rezultirati mikrostrujanjem, što može poboljšati prijenos topline i mase. Implozije mjehurića dovode do promjene tlaka i temperature što dovodi do sudaranja čestica pri velikim brzinama, povećanja pora i ubrzanja difuzije, stanjivanja staničnih membrana, pojačanog prodora otapala u stanice i pojačanog prijenosa ciljnih spojeva u otapalo (Tiwari, 2015; Picó, 2013). Fenomen nazvan 'sonoporacija' predstavlja stvaranje pora tijekom kavitacije, a u staničnim membranama rezultira otpuštanjem bioaktivnih spojeva prisutnih u stanici (Kumar i sur., 2021).



**Slika 5.** Prikaz akustične kavitacije (prema Thi Hong Bui i sur., 2020)

Izvođenje kavitacije ovisi o sposobnost ultrazvuka i njegovim karakteristikama koje uključuju intenzitet i frekvenciju, zatim o svojstvima medija što se odnosi na viskoznost i površinsku napetost te o okolišnim uvjetima npr. tlaku i temperaturi (Tiwari, 2015). UAE se može izvoditi na dva načina, korištenjem ultrazvučne kupelji ili ultrazvučne sonde. Ultrazvučnu kupelj karakterizira spremnik od nehrđajućeg čelika, spojen na sondu, unutar kojeg se čvrsti matriks raspršuje u otapalu. Prepreka korištenja kupelji je njena niska ponovljivost u procesu ekstrakcije iako je ekonomičnija i laka za rukovanje. Ultrazvučna sonda sastoji od sonde spojene na pretvornik te je ona uronjena u posudu za ekstrakciju. Sustavi temeljeni na sondi preferiraju se u usporedbi s kupelji zbog većeg ultrazvučnog intenziteta budući da je vrh sonde uronjen u posudu i ultrazvuk dolazi do medija uz minimalne gubitke energije, također zbog neravnomjerne raspodjele energije kupelji i smanjenja snage s vremenom što smanjuje učinkovitost sustava (Kumar i sur., 2021). Bitan faktor koji pridonosi učinkovitosti UAE je promjer sonde. Sonde manjeg promjera proizvode veći učinak kavitacije, ali u uskom polju, dok s druge strane sonde većeg promjera distribuiraju energiju na šire područje. Glavni nedostatak ove metode, prilikom direktne primjene, je potencijalna kontaminacija metala iz odvojivih metalnih fragmenata sonde (Mehta i sur., 2022). Parametri povezani s UAE u koje se ubrajaju frekvencija, snaga, radni ciklus, temperatura, vrijeme, vrsta otapala, omjer tekućeg i krutog materijala zahtijevaju preciznu kontrolu za optimalnu ekstrakciju (Kumar i sur., 2021).

#### 2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost UAE

Snaga koja se isporuči tijekom UAE izražena je kao postotak amplitude koji obuhvaća raspon od 0 do 100 %, gdje 100 % amplitude označava nazivnu snagu opreme i gustoću snage (W/mL) koja se računa kao snaga rasipana po jedinici volumena ekstrakcijskog medija. Povećanjem snage raste prinos ekstrakcije UAE, a zatim opada nakon dostizanja vrhunca što se može objasniti povećanjem učinka kolapsa kavitacijskih mjehurića. Snaga primijenjena za UAE bioaktivnih tvari iz nusproizvoda voća i povrća i varira u rasponu od 20 do 700 W, a ovisi o spoju koji se ekstrahira i vrsti biljne matrice (Kumar i sur., 2021). Viša amplituda se može odabrati ovisno o svojstvima uzorka, a kod otapala veće viskoznosti preporučljivo je optimizirati razinu amplitude/snage kako bi se postigla željena kavitacija (Tiwari, 2015). Što se tiče frekvencije, poželjna je konstantna niska frekvencija jer dolazi do stvaranja manjeg broja kavitacijskih mjehurića koji imaju relativno veći promjer što dovodi do većeg učinka kavitacije u usporedbi s višim frekvencijama (Mehta i sur., 2022). Frekvencija ultrazvuka i trajanje faze ekspanzije međusobno su obrnuto proporcionalni što znači da pri visokoj frekvenciji kavitacije mjehurić ima vrlo kratko vrijeme za rast što ometa imploziju. Također, stvara se veći otpor prijenosu mase uz veliki broj mjehurića koji se formiraju na visokoj frekvenciji. Frekvencije

korištene u UAE bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda voća i povrća kreću se između 20 i 120 kHz (Kumar i sur., 2021).

Produljenjem vremena prinos UAE se povećava na početku, ali daljnjim povećanjem razdoblja sonikacije prinos se smanjuje (Mehta i sur., 2022). Dulje vrijeme ekstrakcije može povećati prinos, no donosi rizik od degradacije biljnih komponenti zbog produljene izloženosti ultrazvuku. Kako bi se omogućilo dulje vrijeme ultrazvučne obrade, preporuča se koristiti pulsni način rada što uključuje generator koji povremeno aktivira i deaktivira snagu ultrazvučne sonde. Tim povremenim prebacivanjem snage se sprječava prekomjerno povećanje temperature reakcije tijekom produljenog trajanja obrade (Shen i sur., 2023). Oscilacija u temperaturi tijekom UAE neizbježna je zbog primjene zvučne energije te u većini slučajeva povećanje temperature povećava brzinu reakcije. Temperatura se može izvanz kontrolirati tijekom UAE, cirkuliranjem hladne vode tijekom ekstrakcije. Temperatura ekstrakcije, ovisno o ultrazvučnom intenzitetu i otapalu, može varirati između 10 i 80 °C. Visoka temperatura otapala tijekom UAE povećava brzinu difuzije i pomaže u prekidanju interakcije otopljene tvari i matrice (Tiwari, 2015). Odabir otapala ovisi o topljivosti i polarnosti tvari koja se ekstrahira, a prilikom korištenja UAE najčešće se kao otapala koriste voda, etanol, kloroform, aceton, benzen, eter i druga. U ovom radu korišten je 30 %-tni etanol, a inače se etanol koristi za ekstrakciju fenola, aldehida, ketona, estera i drugih polarnih spojeva. Zbog različitih svojstava otapala dolazi do različitih učinaka kavitacije pod istim uvjetima. U obzir treba uzeti viskoznost i hlapivost otapala budući da otapala s većom viskoznošću smanjuju učinak kavitacije, a hlapiva otapala mogu ispariti i smanjiti učinkovitost ekstrakcije ukoliko se ona provodi pri višim temperaturama (Shen i sur., 2023). Povećani omjer otapala i uzorka uzetog za ekstrakciju smanjuje gustoću smjese, odnosno veći volumen otapala daje veće prinose UAE zbog veće učinkovitosti otapanja ciljnih spojeva, čime se poboljšava učinak kavitacije. Prinos UAE raste povećanjem omjera tekućeg i krutog materijala do određene točke, a zatim opada nakon dostizanja vršne vrijednosti. Smanjenje prinosa pri vrlo visokom omjeru tekućeg i čvrstog materijala može se pripisati pojačanom učinku kavitacije što rezultira degradacijom same otopljene tvari (Shen i sur., 2023; Kumar i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak

Materijal korišten u istraživanju je kora banane, sorta Cavendish. Kore su zamrznute pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon čega su liofilizirane, pakirane u vrećice te skladištene na suhom i tamnom mjestu. Neposredno prije provođenja analiza, uzorci su usitnjeni u električnom mlincu (GT11, Tefal, Rumily, Francuska).

##### 3.1.2. Kemikalije i standardi

- Destilirana voda
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %
- Etanol, 96 %
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L (u 96 % etanolu)  
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L  
Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard kvercetina (100 mg/L)  
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.
- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)
- Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminijev klorid, 10 %-tni



Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid–heksahidrat, p.a.) otopi se 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetina (100 mg/L)

Priprema: Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

Priprema: odvažuje se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)

- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Gram-Mol)

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

Priprema: odvažuje se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba)

- Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6

Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens  
Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM  
Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. 500 mg troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.
- 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $K_2S_2O_8$   
Priprema: 0,1892 g  $K_2S_2O_8$  izvažuje se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.
- 7 mM ABTS otopina  
Priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- stabilna ABTS•+ otopina  
Priprema: 88  $\mu$ L  $K_2S_2O_8$  otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija  $K_2S_2O_8$  pri tome je 2,45 mmol/L.
- na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+  
Priprema: 1000  $\mu$ L ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

### 3.1.2. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Zamrzivač (PLATILABTM 340 V 4-STD, Angelantoni Life Science, Massa Martana, Italija)
- Liofilizator (Alpha 1-4 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Analitička vaga (OHAUS AX224, Parsippany, SAD)
- Ultrazvuk (Hielscher UP200Ht ultrasonic processor, Teltow, Njemačka)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)

- Termička kupelj (UP 400 S, Dr. Hielscher GmbH, Njemačka)
- Tehnička vaga (RADWAG, PS 4500.R2, Radom, Poljska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA Works inc, Wilmington, SAD)

Pribor:

- Filter papir
- Lađice za vaganje uzorka
- Menzure
- Stakleni lijevci
- Staklene čaše volumena 50, 100 i 200 mL
- Staklene epruvete
- Plastične epruvete (Falcon)
- Stalak za epruvete
- Automatske pipete 100-1000  $\mu$ L, 5 mL
- Kivete
- Odmjerne tikvice
- Žličice plastične i metalne

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz kore banane primjenom UAE

Izolacija fenolnih spojeva iz kore banane provedena je primjenom UAE uz 30 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije promatrani su parametri: omjer mase uzorka i volumena otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Plan eksperimenta prikazan je u tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz plana eksperimenta

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Amplituda (%)	Vrijeme ekstrakcije (min)
1	1:40	50	5
2			10
3			15
4		75	5
5			10
6			15
7		100	5
8			10
9			15
10	1:50	50	5
11			10
12			15
13		75	5
14			10
15			15
16		100	5
17			10
18			15
19	1:60	50	5
20			10
21			15
22		75	5
23			10
24			15
25		100	5
26			10
27			15

### Postupak

Prema planu provođenja eksperimenta odvaži se potrebna masa usitnjenog uzorka prema zadanom omjeru uzorka i otapala (g/mL) (za omjer 1:40 iznosi 1,25 g, 1:50 = 1 g; 1:60 = 0,83 g) u staklenu čašu te se doda 40 mL 30 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Smjesa se izmiješa te se ekstrakcija provodi pomoću ultrazvučne sonde prema planu eksperimenta uz prilagođavanje amplitude i vremena uz održavanje temperature  $\leq 30$  °C pomoću hladne kupke. Po završetku ekstrakcije, smjesa se profiltrira u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Pripremljeni uzorci se prebace u plastične Falcon epruvete zapremnine 50 mL, dobro zatvore i skladište u hladnjaku do provođenja analiza.

### 3.2.2. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

#### *Princip metode*

Ukupne hidroksicimetne kiseline određuju se iz ekstrakta uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

#### *Priprema ekstrakta*

Ekstrakte kore banane potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

#### *Postupak određivanja*

Redom se u staklenu epruvetu otpipetira 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Slijepa proba priprema se na isti način, osim što se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Prilikom određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri pri 320 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca*

Potrebno je iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline 100 mg/L napraviti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L tako da se iz otopine alikvota redom otpipetira: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Slijepa proba priprema se na isti način, osim što se umjesto ekstrakta dodaje 80 %-tni metanol. U staklenu epruvetu redom se pipetira 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Prilikom određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri pri 320 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi [1]:

$$Y = 0,0035 \cdot X - 0,0082 \quad (R^2 = 0,9977) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L)

Koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražene su u mg ekvivalenata klorogenske kiseline (CAE) na 100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

#### *Princip određivanja:*

Ukupni flavonoidi određuju se iz ekstrakta uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te se nastali intenzitet obojenja mjeri pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

#### *Priprema uzoraka:*

Ekstrakte kore banane potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

#### *Postupak određivanja:*

Redom se u staklenu epruvetu pipetira 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba priprema se na isti način osim što se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa zatim odstoji 30 min, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca*

Pripremi se otopina standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te se otopine standarda rade razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se redom otpipetira 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. U tim tikvicama koncentracije kvercetina iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Za analizu se također uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice redom se otpipetira 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba priprema se na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa potom odstoji 30 min, nakon čega se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija, baždarni pravac se nacrtava pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca računa se koncentracija ukupnih flavonoida.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi [2]:

$$Y = 0,0069 \cdot X + 0,0002 \quad (R^2 = 0,9992) \quad [2]$$

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L)

Koncentracije ukupnih flavonoida izražene su u mg ekvivalenata kvercetina (QE) na 100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

#### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

##### *Princip određivanja*

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedenu reakciju karakterizira smanjenje intenziteta obojenja koje je izravno proporcionalano koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko FeSO<sub>4</sub>, askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

##### *Priprema uzoraka*

Ekstrakte kore banane potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

##### *Postupak određivanja*

Kako bi izmjerili apsorbanciju uzoraka u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je otpipetirati redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa u epruvete. Nakon što se uzorci pripreme, pomoću Vortex miješalice se promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu se dodaje sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo, a apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

##### *Izrada baždarnog pravca*

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjerne tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Na taj način dobije se 2 mM otopina Troloxa (6-

hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrjeđenja na sljedeći način: u tikvice se redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjavaju 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznose 25, 100, 125, 250, 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$ . Nakon toga se u staklene epruvete otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa određene koncentracije i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice izmješaju, a zatim se termostatiraju pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Baždarni pravac nacrtan se iz dobivenih vrijednosti pomoću programa Microsoft Excel, na apscisi su označene koncentracije Troloxa ( $\mu\text{mol/L}$ ), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [3]:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad (R^2 = 0,9995) [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{mol/L}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u mmol Trolox ekvivalenata (TE) na 100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### *Princip određivanja*

Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidanasa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ). U prisutnosti antioksidanasa stabilni  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Vrijednosti dobivene za apsorbanciju uzorka izmjerenih  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

#### *Priprema uzorka*

Ekstrakte kore banane potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.



### *Postupak određivanja*

160 µL razrijeđenog uzorka pomiješa se s 2 mL 1 %-tnog ABTS•+ te se nakon 1 min mjeri apsorbanacija pri 734 nm. Za slijepu probu koristi se etanol 96 %-tni.

### *Izrada baždarnog pravca*

Kako bi se izradio baždarni pravac pripremi se 0,02 mol/L standardna otopina Troloxa tako što se u plastičnoj lađici izvaže 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 µmol/L tako što se redom pipetira 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se zatim do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom. U epruvetu se stavi 160 µL otopine Troloxa i pomiješa s 2 mL 1 %-tnog ABTS•+ te se nakon 1 min mjeri apsorbanacija pri 734 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija baždarni pravac crta se tako da se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 734 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [4]:

$$Y = -0,002 \cdot X + 0,6204 \quad (R^2=0,998) \quad [4]$$

gdje je:

Y – apsorbanacija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine µM

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u mmol Trolox ekvivalenata (TE) na 100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijalni dizajn s tri nezavisne varijable promatrane na tri razine - omjer mase uzorka i volumena otapala, amplituda ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije, dok su kao zavisne varijable promatrani maseni udio hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te antioksidacijska aktivnost određena FRAP i ABTS metodama. Za izradu baždarnih dijagrama i obradu rezultata mjerenja korišten je program Microsoft Excel, a statistička analiza provedena je u programu Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tulsa SAD). Shapiro-Wilk-ov i Leveneov test su primjenjeni za ispitivanje normalnosti i homoskedastičnosti podataka te je na normalno

distribuiranim i homogenim uzorcima provedena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* Tukey testom, dok je na uzorcima koji nisu udovoljili uvjetima normalnosti i homoskedastičnosti proveden neparametrijski Kruskal-Wallis test.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je ekstrakcija hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonoida iz kore banane primjenom UAE uz 30 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo te određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP i ABTS metodama.

Promatran je utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva kore banane, a promatrani parametri uključivali su omjer mase uzorka i volumena otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), amplitudu ultrazvuka (50, 75 i 100 %) te vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min).

U tablici 2 prikazani su rezultati dobiveni spektrofotometrijskim određivanjem masenih udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonoida izoliranih iz kore banane pomoću UAE, a statistička obrada dobivenih rezultata prikazana je u tablici 3. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i ABTS metodama prikazani su u tablici 4, a statistička obrada rezultata u tablici 5.

Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu i tablično prikazani kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.1. UTJECAJ UAE NA UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOIDA KORE BANANE

**Tablica 2.** Maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/100 g) i ukupnih flavonoida (mg QE/100 g) izoliranih iz kore banane primjenom UAE

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Amplituda (%)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Ukupne hidroksicimetne kiseline(mg CAE /100 g)	Ukupni flavonoidi (mg QE/100 g)
1	1:40	50	5	115,89 ± 0,81	45,26 ± 0,41
2			10	108,14 ± 3,21	48,29 ± 0,81
3			15	107,71 ± 4,02	37,96 ± 0,82
4		75	5	106,99 ± 0,00	46,55 ± 1,63
5			10	132,55 ± 0,80	56,64 ± 5,30
6			15	152,59 ± 0,81	67,04 ± 1,64
7		100	5	100,31 ± 0,00	40,27 ± 3,26
8			10	102,48 ± 0,81	41,03 ± 1,64
9			15	91,30 ± 1,61	59,65 ± 0,41
10	1:50	50	5	137,41 ± 0,00	46,95 ± 1,02
11			10	139,11 ± 5,03	64,14 ± 0,00
12			15	151,55 ± 0,00	59,57 ± 4,61
13		75	5	115,71 ± 2,02	37,08 ± 2,56
14			10	135,79 ± 3,01	49,52 ± 2,04
15			15	137,24 ± 0,00	55,21 ± 2,56
16		100	5	116,68 ± 3,03	42,23 ± 2,56
17			10	163,68 ± 1,01	62,11 ± 2,05
18			15	157,76 ± 1,01	49,74 ± 0,00
19	1:60	50	5	168,70 ± 3,63	67,02 ± 1,84
20			10	129,00 ± 2,43	50,29 ± 2,46
21			15	127,39 ± 2,43	52,08 ± 2,46
22		75	5	148,92 ± 3,64	58,20 ± 1,23
23			10	155,25 ± 0,00	53,95 ± 2,47
24			15	190,30 ± 1,22	92,69 ± 0,62
25		100	5	155,04 ± 7,29	71,76 ± 1,85
26			10	174,90 ± 6,08	73,54 ± 1,85
27			15	258,18 ± 7,29	146,74 ± 3,08

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina kretali su se u rasponu od 91,30 ± 1,61 do 258,18 ± 7,29 mg CAE/100 g što je vidljivo iz tablice 2, pri čemu je najniža vrijednost zabilježena kod uzorka 9 gdje je primjenjen omjer uzorka i otapala 1:40 g/mL i amplituda 100 % u vremenskom intervalu od 15 min. Najviša vrijednost određena je kod uzorka 27 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL primjenjena amplituda 100 % u vremenskom intervalu od 15 min. Prosječna vrijednost iznosila je 140,02 mg CAE/100 g (tablica 3).

Maseni udjeli ukupnih flavonoida određeni su u rasponu od  $37,08 \pm 2,56$  do  $146,74 \pm 3,08$  mg QE/100 g. Prosječna vrijednost iznosila je 58,35 mg QE/100 g. Najniža vrijednost zapažena je kod uzorka 13 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:50 g/mL primjenjena amplituda 75 % u vremenskom intervalu od 5 min, a najviša vrijednost određena je kod uzorka 27 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL primjenjena amplituda 100 % u vremenskom intervalu od 15 min.

**Tablica 3.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonoida iz kore banane

Izvor varijacije	N	Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg CAE/100 g)	Ukupni flavonoidi (mg QE/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		p<0,01*	p=0,01*
1:40	18	$113,11 \pm 4,28^a$	$49,19 \pm 2,29^a$
1:50	18	$139,44 \pm 3,79^b$	$51,84 \pm 2,13^a$
1:60	18	$167,52 \pm 9,09^b$	$74,03 \pm 6,96^b$
Amplituda (%)		p=0,60	p=0,51
50	18	$131,66 \pm 4,64^a$	$52,40 \pm 2,18^a$
75	18	$141,71 \pm 5,57^a$	$57,43 \pm 3,60^a$
100	18	$146,70 \pm 11,95^a$	$65,23 \pm 7,58^a$
Vrijeme (min)		p=0,74	p=0,06
5	18	$129,52 \pm 5,47^a$	$50,59 \pm 2,81^a$
10	18	$137,88 \pm 5,50^a$	$55,50 \pm 2,29^a$
15	18	$152,67 \pm 11,23^a$	$68,97 \pm 7,51^a$
Prosječna vrijednost	54	140,02	58,35

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška.

\*statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ .

U tablici 3 prikazani su utjecaji omjera uzorka i otapala, amplitude i vremena tijekom UAE na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonoida izraženih u mg CAE/100 g, odnosno mg QE/100 g. Na temelju statističke analize može se primjetiti kako se jedino omjer uzorka i otapala (g/mL) pokazao kao statistički značajan čimbenik ( $p \leq 0,05$ ).

Najniža vrijednost ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ovom radu zapažena je pri omjeru 1:40 g/mL i iznosi  $113,11 \pm 4,28$  mg CAE/100 g, a povećanjem udjela otapala povećavao se i prinos ekstrakcije. Omjeri uzorka i otapala 1:50 i 1:60 g/mL međusobno se statistički ne razlikuju, ali se statistički značajno razlikuju u usporedbi s omjerom 1:40 g/mL te je vidljivo kako je prinos najveći pri omjeru 1:60 g/mL u iznosu od  $167,52 \pm 9,09$  mg CAE/100 g. Kod ukupnih flavonoida omjeri uzorka i otapala 1:40 i 1:50 g/mL statistički se značajno ne razlikuju, a najmanji prinos u iznosu od  $49,19 \pm 2,29$  mg QE/100 g ostvaren je pri omjeru 1:40 g/mL. Međutim, statistički značajno se razlikuju od omjera 1:60 g/mL pri kojem je ostvaren najveći prinos flavonoida u iznosu od  $74,03 \pm 6,96$  mg QE/100 g. Iz navedenog se može zaključiti kako je optimalan omjer uzorka i otapala za ekstrakciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida iz kore banane 1:60 g/mL.

Općenito, veći volumen otapala rezultirat će većim prinosima ekstrakcije budući da dovodi do povećanja učinkovitosti otapanja ciljanog spoja. Kao rezultat smanjenja gustoće smjese, brzina širenja ultrazvučnih valova je povećana, a smanjeno je prigušenje ultrazvučne snage. Smanjenje viskoznosti smjese dovodi do učinkovitijeg prijenosa energije čime se poboljšava učinkovitost ekstrakcije, odnosno u slučaju UAE pojačava učinak kavitacije. Stoga je optimiranje omjera uzorka i otapala ključno za maksimiziranje učinkovitosti ekstrakcije i postizanje većih prinosa (Shen i sur., 2023). Rezultate slične rezultatima u ovom radu dobili su Kim i Yoon (2023), koji su kao optimalni omjer uzorka i otapala pri UAE fenolnih spojeva kore šipka odredili 53,50 mL/g te se omjer uzorka i otapala pokazao kao statistički značajan čimbenik. Promatrali su omjere od 40 do 60 mL/g te se udio ukupnih fenola povećavao do oko 50-55 mL/g, a zatim je došlo do smanjenja kako se omjer približio 60 mL/g. Živković i sur. (2019) određivali su utjecaj omjera uzorka i otapala na sadržaj ukupnih fenola i pojedinačnih bioaktivnih spojeva (elaginska kiselina, galna kiselina, punikalin i punikalagin) iz ekstrakta kore nara (*Punica granatum* L.). Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije za omjer uzorka i otapala iznosili su 1:44 g/mL. Niže vrijednosti dobili su Vo i sur. (2023) koji su promatrali utjecaj omjera uzorka i otapala (od 10 do 50 mL/g) tijekom UAE te je postupak ekstrakcije fenola i flavonoida iz kore marakuje optimiziran na 28 mL/g. Kao otapalo korištena je smjesa etanola, acetona i vode. Došlo je do povećanja prinosa ekstrakcije fenola i flavonoida povećanjem omjera s 10 na 30 mL/g, što se može pripisati pojačanom učinku kavitacije koji može dovesti do pojačane sonoporacije i fragmentacije na površini materijala, što posljedično olakšava difuziju otapala u biljni materijal. Međutim, povećanjem omjera na 50 mL/g došlo je do smanjenja ukupnih flavonoida. Prevelik omjer uzorka i otapala može uzrokovati veći intenzitet učinka kavitacije na medij za ekstrakciju te tako dovesti do razgradnje flavonoida i smanjenja učinkovitosti ekstrakcije. Isto su potvrdili i Nishad i sur. (2019a) koji su optimirali parametre UAE kako bi se maksimizirao prinos sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida iz kore grejpfruta. Utvrđeno

je da prinos ukupnih fenola raste s povećanjem omjera uzorka i otapala do 30 mL/g, a nakon toga pokazuje trend opadanja. Ovi su rezultati u skladu s načelom prijenosa mase koje objašnjava stvaranje većeg koncentracijskog gradijenta pri visokom omjeru uzorka i otapala, a time i veću difuziju fenola u ekstraktu. Međutim, nakon određene točke dolazi do zasićenja i daljnje povećanje omjera uzrokuje nejednoliku distribuciju fenola i veću izloženost toplini ultrazvučne obrade, što dovodi do značajne redukcije fenolnih spojeva.

Nadalje, amplituda se u ovom radu nije pokazala kao statistički značajan čimbenik. Promatrani su utjecaji amplitude 50, 75 i 100 % te je kod ukupnih hidroksicimernih kiselina najveći prinos ostvaren pri amplitudi 100 % u iznosu od  $146,70 \pm 11,95$  mg CAE/100 g, iako se ta vrijednost nije statistički izdvojila. Najviši prinos ukupnih flavonoida ostvaren je također pri amplitudi 100 % te je iznosio  $65,23 \pm 7,58$  mg QE/100 g, a najmanji prinos pri amplitudi 50 % odnosno  $52,40 \pm 2,18$  mg QE/100 g. Primjećuje se kako povećanjem amplitude ne dolazi do značajnog povećanja prinosa, no s obzirom na ostvarene najviše vrijednosti, može se zaključiti kako je za izolaciju fenola pomoću UAE iz kore banane optimalna amplituda 100 %. Općenito, povećanjem amplitude povećava se broj ciklusa kompresije i ekspanzije ultrazvučnih valova i kao posljedica toga dolazi do većeg prinosa spojeva. Međutim, bitno je naglasiti kako se povećanje prinosa ekstrakcije ne može pripisati isključivo abrazivnim učincima ultrazvučnih valova ili turbulencijama koje stvaraju, već i fizičkim učincima na površini čestica (Medina-Torres i sur., 2017).

Najviša vrijednost ukupnih fenolnih spojeva pri amplitudi 100 % zabilježena je i u istraživanju koje su proveli Júnior i sur. (2021) na kori *Spondias purpurea* L. Nešto nižu vrijednost amplitude zabilježili su Razola-Díaz i sur. (2021) kojima se kao optimalna pokazala amplituda 90 % prilikom UAE fenolnih spojeva i određivanja antioksidacijske aktivnosti iz kore naranče. Belsi i sur. (2024) su kao optimalnu amplitudu odredili 80 % prilikom izolacije polifenola iz kore naranče uz primjenu UAE. Amplituda viša od 85 % nije smatrana prikladnom, kako bi se izbjegao bilo kakav negativan učinak ultrazvuka na polifenolne spojeve i kako bi se spriječili učinci erozije na ultrazvučnu sondu. U istraživanju koje su proveli Nihad i sur. (2019b) amplituda se pokazala kao statistički značajan čimbenik UAE prilikom izolacije polifenola iz kore *Citrus sinensis* (sorta Malta) te su kao optimalnu amplitudu odredili 70,89 %, a promatrali su utjecaje amplitude između 60 i 100 %. Sharaye i sur. (2019) promatrali su utjecaj amplitude 20, 60 i 100 % prilikom UAE na bioaktivne spojeve i antioksidacijsku aktivnost spojeva iz kore šipka. Kao optimalna amplituda, koja se pokazala i kao statistički značajan čimbenik, određena je amplituda 60 %. Kaur i sur. (2022) proveli su standardizaciju UAE za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore manga te su promatrali amplitude od 20 do 50 %. Ultrazvučna amplituda imala je značajan učinak na ekstrakciju fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost kore manga pri čemu je najviši sadržaj fenola uočen pri amplitudi od 40 %, nakon čega je zabilježeno smanjenje.

Kada se promatra vrijeme ekstrakcije, ukupne hidroksicimetne kiseline su najveći prinos u iznosu od  $152,67 \pm 11,23$  mg CAE/100 g ostvarile pri trajanju 15 min, dok su najniže vrijednosti ostvarene pri trajanju 5 min u iznosu od  $129,52 \pm 5,47$  mg CAE/100 g. Što se tiče ukupnih flavonoida, najviši prinos dobiven je ekstrakcijom u trajanju 15 min te je iznosio  $68,97 \pm 7,51$  mg QE/100 g, a najniža vrijednost ostvarena je pri trajanju 5 min u iznosu od  $50,59 \pm 2,81$  mg QE/100 g. U oba slučaja nijedna vrijednost se nije statistički izdvojila te vrijeme ne predstavlja statistički značajan čimbenik stoga se kao optimalna vrijednost uzima ona koja je ostvarila najviše prinose. S obzirom na najviše vrijednosti koncentracija i ukupnih hidroksimetnih kiselina i flavonoida, iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je optimalno vrijeme ekstrakcije za ukupni ekstrakt u ovom radu 15 min.

Jednake rezultate dobili su Júnior i sur. (2021) gdje su najveće vrijednosti ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti iz kore *Spondias purpurea* L. određene pri optimalnom vremenu ekstrakcije u trajanju od 15 min. Kumar i Srinivasa Rao (2020) u svom istraživanju proveli su UAE u pulsnom modu za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz kore nara (*P. granatum* L.) te su promatrali vrijeme ekstrakcije od 5 do 15 min kako bi se maksimizirao prinos ukupnog sadržaja fenola, flavonoida, ukupnog kondenziranog i hidrolizirajućeg tanina te antioksidativne aktivnosti te je kao optimalno vrijeme određeno 12,8 min. Povećanje ukupnih fenola pri dužem vremenu sonikacije i radnom ciklusu može biti posljedica povećanja stvaranja mikromjehurića, što dovodi do oštećenja stanica i samim time većeg oslobađanja fenola. Nižu vrijednost odredili su Sharayei i sur. (2019) odnosno optimalno vrijeme ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore nara (*Punica granatum* L.) iznosilo je 6,2 min. Suprotno tome, Živković i sur. (2019) kao optimalno vrijeme ekstrakcije polifenolnih komponenti iz kore nara (*P. granatum* L.) odredili su 25 min. Najveći prinos ukupnih polifenola iz kore šipka pri duljem trajanju ekstrakcije zabilježili su Kim i Yoon (2023) gdje je optimalno vrijeme ekstrakcije iznosilo 29,5 min. Promatrali su trajanje ekstrakcije od 20 do 40 min te su zamijetili kako se prinos polifenola povećavao s vremenom ekstrakcije do 30 min, nakon čega je uslijedilo postupno smanjenje prinosa nakon 35 min. Razola-Díaz i sur. (2021) proveli su optimiranje UAE fenolnih spojeva iz kore naranče te su kao optimalno vrijeme ekstrakcije odredili 35 min. Isto su zabilježili Nihad i sur. (2019b), kao optimalno vrijeme ekstrakcije odredili su 35 min prilikom UAE polifenola iz kore *C. sinensis* (sorta Malta). Shehata i sur. (2021) proveli su optimizaciju uvjeta UAE ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz narančine kore korištenjem metodologije površine odziva te su kao optimalno vrijeme ekstrakcije ukupnih fenola i ukupnih flavonoida odredili 44 min. U istraživanju koje su proveli Ma i sur. (2009) određeno je kako optimalno vrijeme ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina iz kore mandarine (*Citrus unshiu* Marc) primjenom UAE iznosi 40 min, a isto su utvrdili i Nipornram i sur. (2018) koji su proveli optimiziranje uvjeta UAE kako bi povećali prinos ekstrakta, ukupni sadržaj fenola i flavonoida iz kore mandarine (*Citrus Reticulata* Blanco cv. Sainampung).



Zaključno, sa ciljem ostvarenja najviših prinosa ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, kao optimalni uvjeti za ekstrakciju iz kore banane pokazali su se omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL, amplituda 100 % te vrijeme 15 min.

## 4.2. UTJECAJ UAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST SPOJEVA KORE BANANE

**Tablica 4.** Antioksidacijska aktivnost ekstrakata kore banane (mmol TE/100 g) određena FRAP i ABTS metodom u ovisnosti o uvjetima UAE

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Amplituda (%)	Vrijeme ekstrakcije (min)	FRAP (mmol TE/100 g)	ABTS (mmol TE/100 g)
1	1:40	50	5	2,87 ± 0,20	3,76 ± 0,13
2			10	2,99 ± 0,27	4,22 ± 0,25
3			15	2,32 ± 0,38	3,58 ± 0,08
4		75	5	4,27 ± 0,06	1,21 ± 0,00
5			10	4,89 ± 0,11	5,31 ± 0,04
6			15	4,36 ± 0,11	5,50 ± 0,01
7		100	5	5,61 ± 0,40	1,21 ± 0,00
8			10	4,07 ± 0,10	4,71 ± 0,04
9			15	5,38 ± 0,43	5,04 ± 0,20
10	1:50	50	5	3,75 ± 0,08	5,32 ± 0,10
11			10	5,55 ± 0,07	6,73 ± 0,04
12			15	4,87 ± 0,01	5,22 ± 0,05
13		75	5	6,05 ± 0,09	7,23 ± 0,03
14			10	5,31 ± 0,16	6,51 ± 0,02
15			15	5,32 ± 0,24	5,51 ± 0,12
16		100	5	6,74 ± 0,01	6,73 ± 0,03
17			10	4,82 ± 0,08	5,32 ± 0,11
18			15	4,99 ± 0,16	5,69 ± 0,15
19	1:60	50	5	4,52 ± 0,08	5,02 ± 0,26
20			10	5,00 ± 0,11	6,34 ± 0,36
21			15	4,51 ± 0,16	5,15 ± 0,18
22		75	5	5,92 ± 0,23	6,87 ± 0,05
23			10	5,57 ± 0,44	6,32 ± 0,00
24			15	7,71 ± 0,13	7,53 ± 0,03
25		100	5	4,73 ± 0,02	5,88 ± 0,01
26			10	6,77 ± 0,47	6,60 ± 0,03
27			15	8,65 ± 0,00	8,43 ± 0,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Prema rezultatima prikazanim u tablici 4 vidljivo je kako se antioksidacijska aktivnost određena u ekstraktima kore banane FRAP metodom kreće u rasponu od  $2,32 \pm 0,38$  do  $8,65 \pm 0,00$  mmol TE/100 g. Prosječna vrijednost iznosi 5,09 mmol TE/100 g (tablica 5). Najniža vrijednost određena je kod uzorka 3 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL primjenjena amplituda 50 % u vremenskom trajanju od 15 min. Najviša vrijednost zabilježena je kod uzorka 27 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL primjenjena amplituda 100 % u vremenskom intervalu od 15 min.

Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom kreće se u rasponu od  $1,21 \pm 0,00$  do  $8,43 \pm 0,02$  mmol TE/100 g. Prosječna vrijednost iznosi 5,44 mmol TE/100 g, a najniža vrijednost određena je u uzorku broj 4 pri omjeru otapala i uzorka 1:40 g/mL i primjeni amplitude 75 % u vremenskom intervalu od 5 min. Najviša vrijednost pripada uzorku 27 gdje je pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL primjenjena amplituda 100 % u vremenskom intervalu od 15 min.

**Tablica 5.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na antioksidacijsku aktivnost spojeva kore banane (mmol TE/100 g) određenih FRAP i ABTS metodom

Izvor varijacije	N	FRAP (mmol TE/100 g)	ABTS (mmol TE/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		p=0,07	p<0,01*
1:40	18	$4,08 \pm 0,27^a$	$3,84 \pm 0,37^a$
1:50	18	$5,27 \pm 0,19^a$	$6,03 \pm 0,18^b$
1:60	18	$5,93 \pm 0,34^a$	$6,46 \pm 0,25^b$
Amplituda (%)		p<0,01*	p=0,03*
50	18	$4,04 \pm 0,26^a$	$5,04 \pm 0,24^a$
75	18	$5,49 \pm 0,24^b$	$5,78 \pm 0,43^b$
100	18	$5,75 \pm 0,33^b$	$5,51 \pm 0,45^{a,b}$
Vrijeme (min)		p=0,64	p=0,80
5	18	$4,94 \pm 0,28^a$	$4,80 \pm 0,53^a$
10	18	$5,00 \pm 0,24^a$	$5,78 \pm 0,21^a$
15	18	$5,35 \pm 0,43^a$	$5,74 \pm 0,33^a$
Prosječna vrijednost	54	5,09	5,44

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška.

\*statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ .

U tablici 5 prikazan je utjecaj omjera uzorka i otapala, amplitude i vremena tijekom UAE na antioksidacijsku aktivnost (mmol TE/100 g) spojeva kore banane određenih FRAP i ABTS metodama. Kod FRAP metode vidljivo je kako se samo amplituda pokazala kao statistički značajan čimbenik ( $p \leq 0,05$ ). Kod ABTS metode statistički značajni čimbenici bili su omjer uzorka i otapala te amplituda ( $p \leq 0,05$ ).

Na temelju rezultata statističke analize, vidljivo je kako kod FRAP metode omjer uzorka i otapala nije imao statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost te je najniža vrijednost dobivena kod omjera 1:40 g/mL u iznosu od  $4,08 \pm 0,27$  mmol TE/100 g, a najviša vrijednost pri omjeru 1:60 g/mL u iznosu od  $5,93 \pm 0,34$  mmol TE/100 g. Povećanjem udjela otapala kod FRAP i ABTS metoda došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod ABTS metode određena je kod omjera 1:60 g/mL u iznosu od  $6,46 \pm 0,25$  mmol TE/100 g, ali se statistički ne razlikuje od omjera 1:50 g/mL u iznosu od  $6,03 \pm 0,18$  mmol TE/100 g. Budući da obje metode najviše vrijednosti ostvaruju pri najvećem omjeru uzorka i otapala, kao optimalan parametar ekstrakcije za obje metode može odrediti omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL, što je u skladu i s uvjetima optimalnim za izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida.

Tabaraki i sur. (2012) proučavali su utjecaj omjera uzorka i otapala na ekstrakciju antioksidansa s pet omjera 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 i 1:60 g/mL tijekom 20 min iz kore nara (*P. granatum* L.). Rezultati su pokazali kako se ekstrakcija antioksidansa i njihov prinos povećavaju s povećanjem omjera otapala i uzorka što je u skladu s načelima prijenosa mase. Međutim, viši omjer otapala i uzorka može značiti veću upotrebu otapala u ekstrakciji i potrošnju energije u kasnijoj fazi obrade. ANOVA je pokazala kako nema značajne razlike pri ekstrakciji antioksidansa između omjera uzorka i otapala od 1:50 i 1:60 g/mL kod FRAP i DPPH metode. Stoga je kao optimalan omjer uzorka i otapala uzet 1:50 g/mL kako bi se smanjila uporaba otapala. Vrijednosti određene FRAP metodom kretale su se od 24,30 do 63,37 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g s.t.. Castañeda-Valbuena i sur. (2021) istraživali su utjecaj UAE na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata nusproizvoda manga odnosno kore i sjemenki te su odredili kako je antioksidacijska aktivnost ekstrakata sjemenki bila veća nego kod ekstrakata kore. Omjer uzorka i otapala (g/mL) pokazao je statistički značajan učinak ( $p < 0,05$ ) kod ABTS metode iz ekstrakata kore. Promatrani su omjeri od 1:30 do 1:50 g/mL te je kao optimalan omjer uzorka i otapala odabran 1:50 g/mL, a vrijednosti antioksidativne aktivnosti ekstrakata iz kore manga kretale su se za ABTS od 239,13 do 1155,83 mg TE/g i FRAP od 7,11 do 100,89 mg TE/g. Općenito, kada se koriste visoki omjeri otopljene tvari i otapala, fenomen prijenosa mase se ubrzava zbog prisutnosti većeg koncentracijskog gradijenta između čestica (uzorka) i tekuće faze (otapala) i što više ekstrahiranih spojeva imaju to više antioksidativnog kapaciteta mogu očekivati od ekstrakata (Castañeda-Valbuena i sur., 2021).

Vu i sur. (2017) optimizirali su UAE parametare pri ekstrakciji fenolnih spojeva i određivali antioksidacijsku aktivnost kore banane (*Musa cavendish*). Pokazali su kako je povećanje temperature, vremena, snage te omjera uzorka i otapala prilikom UAE dovelo do blago smanjenih antioksidacijskih svojstava. Kao optimalni uvjeti ekstrakcije određeni su: omjer uzorka i otapala 8:100 g/mL, vrijeme 5 min, snaga 150 W (60 %), koncentracija acetona 60 %

te temperatura 30 °C. U njihovom radu, značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom ( $p < 0,05$ ) imaju omjer uzorka i otapala te koncentracija otapala (acetona). Odredili su i kako vrijeme UAE te koncentracija acetona značajno utječu na antioksidacijsku aktivnost FRAP ekstrakta kore banane ( $p < 0,05$ ). Duže vrijeme UAE generiralo je ekstrakte s nižim FRAP vrijednostima, koje su se povećale kada je koncentracija acetona porasla na 60 %, a zatim smanjile dodatnim porastom koncentracije na 80 %. Međutim, utvrdili su kako UAE temperatura, snaga te omjer uzorka i otapala nemaju značajan utjecaj na FRAP ( $p > 0,05$ ). Antioksidacijski kapacitet ABTS iznosio je 48,38 mg TE/g s.t., a FRAP of 42,26 mg TE/g s.t.. Aznar-Ramos i sur. (2022) uspoređivali su ultrazvučnu kupelj i sondu prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz nusproizvoda kore manga. Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti, vrijednosti za ekstrakte dobivene u ultrazvučnoj kupelji kretale su se kod DPPH od 3,4 do 17,8 mg TE/g s.t., ABTS od 3,9 do 24,8 mg TE/g s.t. i FRAP od 4,0 do 16,5 mg TE/g s.t., dok su vrijednosti prilikom ekstrakcije sa sondom bile u rasponu od 10,1 do 28,7 mg TE/g s.t. za DPPH, od 13,6 do 44,3 mg TE/g s.t. za ABTS, odnosno od 13,7 do 33,8 mg TE/g s.t. za FRAP. Trend rezultata analize antioksidansa bio je vrlo sličan rezultatima ukupnih fenolnih spojeva odnosno najniže i najviše vrijednosti dobivene su pri istim uvjetima u oba modela. Kao optimalni uvjeti ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji određeni su koncentracija etanola 45 %, vrijeme 60 min i omjer uzorka i otapala 1:450 g/mL, dok su optimalni uvjeti za ekstrakciju sondom bili koncentracija etanola 55 %, vrijeme 18 min i amplituda 65 %.

Nadalje, iz tablice primjećujemo kako je povećanjem amplitude došlo i do značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti te da se amplituda kod FRAP metode pokazala kao statistički značajan čimbenik. Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti bilježi se pri amplitudi 50 %, a primjenom amplitude 100 % dobivena je najviša prosječna vrijednost od  $5,75 \pm 0,33$  mmol TE/100 g, međutim ona se statistički značajno ne razlikuje od vrijednosti pri amplitudi 75 % koja iznosi  $5,49 \pm 0,24$  mmol TE/100 g. Budući da se najveći prinos ostvario pri amplitudi 100 %, ona se može uzeti kao optimalna kod FRAP metode. Vrijednosti amplitude kod ABTS metode statistički se značajno razlikuju između 50 i 75 %, dok se amplituda 100 % statistički značajno ne razlikuje u odnosu na preostale dvije, odnosno povećanje prinosa vidljivo je povećanjem amplitude s 50 na 75 %, a zatim dolazi do smanjenja prinosa povećanjem amplitude na 100 %. Najviša vrijednost ostvarena je pri amplitudi 75 % te iznosi  $5,78 \pm 0,43$  mmol TE/100 g, stoga se kao optimalna amplituda za ABTS uzima 75 %.

Slično dobivenim rezultatima, istraživanje koje su proveli Júnior i sur. (2021) pokazalo je značajno povećanje antioksidacijske aktivnosti FRAP-a s povećanjem amplitude. Promatrali su amplitude 20, 60 i 100 % te je pri amplitudi 100 % ostvarena najveća antioksidacijska aktivnost. U istraživanju koje su proveli Razola-Díaz i sur. (2021) najveća antioksidacijska aktivnost iz kore naranče određena ABTS metodom dobivena je primjenom amplitude 90 %. U istraživanju

koje su proveli Castañeda-Valbuena i sur. (2021) statistička analiza pokazala je kako amplituda nije imala značajan učinak na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kore manga ( $p > 0,05$ ), promatrane su amplitude od 40 do 76 % te je kao optimalna određena amplituda 76 %.

Nadalje, uz omjer uzorka i otapala, vidljivo je kako ni vrijeme ne pokazuje statistički značajan utjecaj kod FRAP metode. Najviša vrijednost bilježi se pri trajanju ekstrakcije od 15 min, u iznosu od  $5,35 \pm 0,43$  mmol TE/100 g te se u ovom slučaju 15 min može uzeti kao optimalno vrijeme ekstrakcije. Vrijeme se ni kod ABTS metode nije pokazalo kao statistički značajan čimbenik, a najviša vrijednost zabilježena je u vremenskom intervalu od 10 min u iznosu od  $5,78 \pm 0,21$  mmol TE/100 g, stoga se 10 min može smatrati optimalnim vremenom ekstrakcije za ABTS metodu.

U istraživanju koje su na kori šipka proveli Tabaraki i sur. (2012) vrijeme ekstrakcije značajno je utjecalo na FRAP vrijednost. Duže vrijeme ekstrakcije imalo je pozitivan učinak na sadržaj ukupnih fenola, FRAP, DPPH i prinos ekstrakcije na konstantnoj temperaturi i koncentraciji etanola. Optimalno vrijeme ekstrakcije za sve određivane komponente iznosilo je 30 min. Zhong i sur. (2022) proveli su alkalnu hidrolizu potpomognutu ultrazvukom za ekstrakciju polifenola iz kore pitahaje (*Hylocereus undatus* 'Foo-Lon'). Primijenjeno vrijeme sonikacije nalazilo se u rasponu od 15 do 75 min te je rezultiralo povećanim prinosom ekstrakta koji je dostigao maksimum nakon 45 min. Međutim, dodatnim produljenjem vremena sonikacije, ukupni sadržaj fenola ekstrakta nije značajno fluktuirao, dok se ukupni sadržaj flavonoida neznatno smanjio. To se može pripisati mehaničkom učinku smicanja ultrazvuka. Ovaj bi učinak mogao uništiti staničnu stijenku, pospješiti otapanje aktivnih komponenti u stanici i poboljšati brzinu ekstrakcije ciljnih spojeva. Međutim, prejak mehanički učinak može dovesti do razgradnje i razaranja strukture polifenola i smanjenja aktivnih sastojaka. Optimalni uvjeti ekstrakcije za aktivnost ABTS su u skladu s ukupnim fenolima i flavonoidima, odnosno vrijeme sonikacije u iznosu od 45 min.

Temeljem svih prikazanih rezultata može se utvrditi kako su u ovom radu optimalni uvjeti UAE za proizvodnju ekstrakata kore banane s najvišom antioksidacijskom vrijednosti izmjerene FRAP metodom bili isti kao i oni za izolaciju ukupnih hidrocimetnih kiselina i flavonoida, omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL, amplituda 100 % i vrijeme 15 min, dok je ABTS metoda pokazala drugačiji trend i rezultirala najvišim vrijednostima pri nešto nižoj amplitudi i vremenu ekstrakcije, točnije omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, amplitudi 75 % i vremenu 10 min.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom UAE iz kore banane izolirane su hidroksicimetne kiseline s prosječnom vrijednošću 140,02 mg CAE/100 g i flavonoidi 58,35 mg QE/100 g.
2. Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 5,09 mmol TE/100 g i ABTS metodom 5,44 mmol TE/100 g.
3. Od ispitivanih parametara (omjer uzorka i otapala, amplituda ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije) samo omjer uzorka i otapala ima statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, dok na antioksidacijsku aktivnost statistički značajno ( $p < 0,05$ ) kod ABTS metode utječu omjer uzorka i otapala te amplituda, a kod FRAP metode samo amplituda.
4. Povećanjem omjera uzorka i otapala došlo je do povećanja masenih udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida i povećanja antioksidacijske aktivnosti.
5. Optimalni parametri za izolaciju hidroksicimetnih kiselina i flavonoida primjenom UAE su omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL, amplituda 100 % i vrijeme 15 min što vrijedi i za ostvarivanje najviše antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom. Kod ABTS metode optimalni uvjeti su omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL, amplituda 75 % i vrijeme 10 min.
6. UAE se pokazala kao učinkovita metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore banane.

## 6. LITERATURA

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* **4**, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Alzate Acevedo S, Díaz Carrillo ÁJ, Flórez-López E, Grande-Tovar CD (2021) Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a Circular Economy. *Molecules* **26(17)**, 5282. <https://doi.org/10.3390/molecules26175282>

Arvanitoyannis I, Mavromatis A (2009) Banana Cultivars, Cultivation Practices, and Physicochemical Properties. *Crit Rev Food Sci* **49(2)**, 113–135. <https://doi.org/10.1080/10408390701764344>

Aurore G, Parfait B, Fahrasmane L (2009) Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends Food Sci Tech* **20(2)**, 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>

Aznar-Ramos MJ, Razola-Díaz MdC, Verardo V, Gómez-Caravaca AM (2022) Comparison between Ultrasonic Bath and Sonotrode Extraction of Phenolic Compounds from Mango Peel By-Products. *Horticulturae* **8(11)**, 1014. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111014>

Belsi K, Vogiatzi X, Palaiogiannis D, Chatzimitakos T, Lalas SI, Makris DP (2024) Ultrasonication-Assisted Aqueous Extraction of Waste Orange Peel Polyphenols: Optimization of Process Variables and Effect on Extract Composition. *Compounds* **4(2)**, 301-314. <https://doi.org/10.3390/compounds4020016>

Castañeda-Valbuena D, Ayora-Talavera T, Luján-Hidalgo C, Álvarez-Gutiérrez P, Martínez-Galero N, Meza-Gordillo R (2021) Ultrasound extraction conditions effect on antioxidant capacity of mango by-product extracts. *Food Bioprod Process* **127**, 212-224. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.03.002>.

Chendake S, Kale T, Manavadaria Y, Motimath AS (2021) Evaluation of Banana Leaves (*Musa paradisiaca*) as an Alternative Wound Dressing Material Compared to Conventional Petroleum Jelly Gauze Dressing in Contused, Lacerated and Sutured Wounds Over the Head, Neck and Face Region. *Cureus* **13(10)**, e18552. <https://doi.org/10.7759/cureus.18552>



Choudhury N, Nickhil C, Chandra Deka S (2023) Comprehensive review on the nutritional and therapeutic value of banana by-products and their applications in food and non-food sectors. *Food Biosci* **56**, 103416. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103416>.

Chueh CC, Lin LJ, Lin WC, Huang SH, Jan MS, Chang SC i sur. (2019) Antioxidant capacity of banana peel and its modulation of Nrf2-ARE associated gene expression in broiler chickens. *Ital J Anim Sci* **18(1)**, 1394–1403. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1667884>

Dobiáš P, Pavlíková P, Adam M, Eisner A, Švecová B, Ventura K (2010) Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Cent Eur J Chem* **8**, 87-95. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0125-9>

Genç Y, Bardakci H, Yücel Ç, Karatoprak GŞ, Küpeli Akkol E, Hakan Barak T i sur. (2020) Oxidative Stress and Marine Carotenoids: Application by Using Nanoformulations. *Mar Drugs* **18(8)**, 423. <https://doi.org/10.3390/md18080423>

Hassan UF, Hassan HF, Ushie OA, Ibrahim AH, Tabe NN (2018) Exploring the Potentials of Banana (*Musa Sapientum*) Peels in Feed Formulation. *Int J Adv Res Chem Sci* **5**, 10-14. <https://doi.org/10.20431/2349-0403.0505003>

Hermanns AS, Zhou X, Xu Q, Tadmor Y, Li L (2020) Carotenoid Pigment Accumulation in Horticultural Plants. *Hortic Plant J* **6(6)**, 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.10.002>.

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (2007) Domestication, genomics and the future for banana. *Ann Bot* **100(5)**, 1073–1084. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm191>

Hikal WM, Said-Al Ahl HAH, Bratovic A, Tkachenko KG, Sharifi-Rad J, Kačániová M i sur. (2022) Banana Peels: A Waste Treasure for Human Being. *Evid Based Complement Alternat Med*, 7616452. <https://doi.org/10.1155/2022/7616452>

Júnior MES, Araújo MVRL, Santana AA, Silva FLH, Maciel MIS (2021) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. *Arab J Chem* **14(8)**, 103260. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103260>.

Kaur B, Panesar PS, Anal AK (2022) Standardization of ultrasound assisted extraction for the

recovery of phenolic compounds from mango peels. *J Food Sci Technol* **59(7)**, 2813–2820. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05304-0>

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18(2)**, 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>

Kim HJ, Yoon KY (2023) Optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of bioactive compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Food Sci Biotechnol* **32(13)**, 1851–1860. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01298-x>

Kora AJ (2019) Leaves as dining plates, food wraps and food packing material: Importance of renewable resources in Indian culture. *Bull Nat Res Cent* **43(1)**, 205. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0231-6>

Kumar A, Srinivasa Rao P (2020) Optimization of pulsed-mode ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *J Food Meas Charact* **14**, 3493–3507. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00597-9>

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Kumari P, Gaur SS, Tiwari RK (2023) Banana and its by-products: A comprehensive review on its nutritional composition and pharmacological benefits. *eFood* **4(5)**, e110. <https://doi.org/10.1002/efd2.110>

Liu RH (2013) Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr* **4(3)**, 384–392. <https://doi.org/10.3945/an.112.003517>

Ma YQ, Chen JC, Liu DH, Ye XQ (2009) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound, *Ultrason Sonochem* **16(1)**, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.012>.

Manthey J, Jaitrong S (2016) An HPLC-MS analysis of phenolic antioxidant in banana peel. *Proc Fla State Hort Soc* **129**, 181–184. <https://www.researchgate.net/publication/317718556>

Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* **74**, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>

Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L (2023) Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: A Comprehensive Review. *Molecules* **28(14)**, 5344. <https://doi.org/10.3390/molecules28145344>

Mat K, Taufik HA, Rusli ND, Hasnita CH, Al-Amsyar SM, Rahman MM i sur. (2020) Effects of fermentation on the nutritional composition, mineral content and physical characteristics of banana leaves. *Environ Earth Sci* **596(1)**, 012089. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/596/1/012089>

Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N (2017) Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **7(3)**, 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>

Meenashree B, Vasanthi VJ, Mary RNI (2014) Evaluation of total phenolic content and antimicrobial activities exhibited by the leaf extracts of *Musa acuminata* (banana). *Int J Curr Microbiol App Sci* **3(5)**, 136-141. <http://www.ijcmas.com>

Mehta N, S J, Kumar P, Verma AK, Umaraw P, Khatkar SK i sur. (2022) Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods* **11(19)**, 2973. <https://doi.org/10.3390/foods11192973>

Moharram HA, Youssef MM (2014) Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alex J Fd Sci Technol* **11(1)**, 31-42. <https://doi.org/10.12816/0025348>

Nipornram S, Tochampa W, Rattanatraiwong P, Singanusong R (2018) Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampuang) peel. *Food Chem* **241**, 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>.

Nishad J, Saha S, Kaur C (2019b) Enzyme and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. *J Food Process Preserv* **43**, e14046. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14046>

Nishad J, Saha S, Dubey AK, Varghese E, Kaur C (2019a) Optimization and comparison of non-conventional extraction technologies for *Citrus paradisi* L. peels: a valorization approach. *J Food Sci Technol* **56(3)**, 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03585-0>

Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W (2021) Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. *Materials* **14(8)**, 1984. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>

Pereira A, Maraschin M (2015) Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *J Ethnopharmacol* **160**, 149-163. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.008>

Picó Y (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends Anal Chem* **43**, 84-99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005>

Qamar S, Shaikh A (2018) Therapeutic potentials and compositional changes of valuable compounds from banana- A review. *Trends Food Sci Tech* **79**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.016>

Rahman MM, Rahaman MS, Islam MR, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T i sur. (2021) Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules* **27(1)**, 233. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>

Razola-Díaz MdC, Guerra-Hernández EJ, Rodríguez-Pérez C, Gómez-Caravaca AM, García-Villanova B, Verardo V (2021) Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Orange By-Product. *Proceedings* **70(1)**, 49. [https://doi.org/10.3390/foods\\_2020-07691](https://doi.org/10.3390/foods_2020-07691)

Rebello LPG, Ramos AM, Becker Pertuzatti P, Teixeira Barcia M, Castillo-Muñoz N, Hermosín-Gutiérrez I (2014) Flour of banana (*Musa* AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Int Food Res* **55**, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.039>

Selvamuthukumar M, Shi J (2017) Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Qual Saf* **1(1)**, 61-81. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx004>

Shahidi F, Yeo J (2016) Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules* **21(9)**, 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>

Sharayei P, Azarpazhooh E, Zomorodi S, Ramaswamy HS (2019) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT Food Sci Technol* **101**, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>.

Shehata MG, Abd El Aziz NM, Youssef MM, El-Sohaimy SA (2021) Optimization conditions of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from orange peels using response surface methodology. *J Food Process Preserv* **45**, e15870. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15870>

Shen L, Pang S, Zhong M, Sun Y, Qayum A, Liu Y i sur. (2023) A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrason Sonochem* **101**, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>

Sidhu JS, Zafar TA (2018) Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Qual Saf* **2(4)**, 183–188. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy019>

Sivasamugham LA, Nimalan V, Subramaniam G (2021) Antibacterial effects of Musa sp. ethanolic leaf extracts against methicillin-resistant and susceptible Staphylococcus aureus. *S Afr J Chem Eng* **35**, 107-110. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.09.007>.

Soltani M, Alimardani R, Omid M (2011) Evaluating banana ripening status from measuring dielectric properties. *J Food Eng* **105(4)**, 625-631. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.032>.

Sulaiman SF, Yusoff NA, Eldeen IM, Seow EM, Bakar AA, Supriatno P i sur. (2011) Correlation between total phenolic and mineral content with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *J Food Compos Anal* **24**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.005>.

Tabaraki R, Heidarzadi E, Benvidi A (2012) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep Purif Technol* **98**, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.038>.

Thi Hong Bui A, Cozzolino D, Zisu B, Chandrapala J (2020) Effects of high and low frequency ultrasound on the production of volatile compounds in milk and milk products – a review. *J Dairy Res* **87(4)**, 501-512. <https://doi.org/10.1017/S0022029920001107>

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal Chem* **71**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Vo TP, Nguyen NTU, Le VH, Phan TH, Nguyen THY, Nguyen DQ (2023) Optimizing Ultrasonic-Assisted and Microwave-Assisted Extraction Processes to Recover Phenolics and Flavonoids from Passion Fruit Peels. *ACS omega* **8(37)**, 33870–33882. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04550>

Vu HT, Scarlett CJ, Voung QV (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *J Funct Food* **40**, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>

Vu HT, Scarlett CJ, Voung QV (2019) Changes of phytochemicals and antioxidant capacity of banana peel during the ripening process; with and without ethylene treatment. *Sci Hortic* **253**, 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.043>.

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2017) Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *J Food Process Preserv* **41**, e13148. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13148>

Yan I, Fernando WMADB, Brennan M, Brennan CS, Jayasena V, Coorey R(2016), Effect of extraction method and ripening stage on banana peel pigments. *Int J Food Sci Technol* **51**, 1449-1456. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13115>

Zaini HMi, Roslan J, Saallah S, Munsu E, Sulaiman NS, Pindi W (2022) Banana peels as a bioactive ingredient and its potential application in the food industry. *J Funct Foods* **92**, 105054. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105054>.

Zhang JW, Wang JH, Wang GH, Wang CC, Huang RQ (2019) Extraction and characterization of phenolic compounds and dietary fibres from banana peel. *Acta Aliment* **48(4)**, 525-537. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.4.14>

Zhong X, Zhang S, Wang H, Yang J, Li L, Zhu J i sur. (2022) Ultrasound-alkaline combined extraction improves the release of bound polyphenols from pitahaya (*Hylocereus undatus* 'Foo-Lon') peel: Composition, antioxidant activities and enzyme inhibitory activity. *Ultrason Sonochem* **90**, 106213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106213>.

Zou F, Tan C, Zhang B, Wu W, Shang N (2022) The Valorization of Banana By-Products: Nutritional Composition, Bioactivities, Applications, and Future Development. *Foods* **11(20)**, 3170. <https://doi.org/10.3390/foods11203170>

Živković J, Šavikin K, Janković T, Čujić N, Menković N (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Sep Purif Technol* **194**, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.032>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marija Šuto izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis