

Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i niskotemperaturnih eutektskih otapala u valorizaciji kore banane

Zorić, 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:159:431593>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Marija Zorić

**PRIMJENA EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA I
NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH
OTAPALA U VALORIZACIJI KORE BANANE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća, povrća i začinskog bilja na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Repajić te uz pomoć dr. sc. Ene Cegledi.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Repajić na uloženom trudu, vremenu, podršci i ažurnosti, kao i na svim stručnim i prijateljskim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem dr. sc. Eni Cegledi na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Posebno hvala svim svojim prijateljima i kolegama, koji su mi neizmjereno uljepšali ovaj period studiranja i svaki dan učinili nezaboravnim. Bez vas studiranje ne bi bilo toliko zabavno!

Najveće zahvale upućujem svojim roditeljima Sandri i Žarku koji su činili sve kako bi mi omogućili bezbrižno školovanje ispunjeno podrškom i ljubavlju, kao i svojoj sestri Matiji i teti Jasni te dečku Roku. Hvala vam što ste uvijek bili tu za mene, slušali me, poticali i najvažnije, vjerovali u moj uspjeh.

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: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

PRIMJENA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA I NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA U VALORIZACIJI KORE BANANE

Marija Zorić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215381

Sažetak: Cilj ovog rada bio je optimirati parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za izolaciju fenolnih spojeva iz kore banane te odrediti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata. Kao otapalo korišteno je niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES), smjesa kolin-klorida i glicerola u omjeru 1:3 s 30 % vode (w/w). Ispitan je utjecaj temperature (40, 60 i 80 °C), vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te omjera uzorka i otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL). U ekstraktima su određeni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te antioksidacijski kapacitet. Prosječne vrijednosti iznosile su: 378,96 mg ekvivalenata klorogenske kiseline (CE)/100 g (hidroksicimetne kiseline), 189,69 mg ekvivalenata kvercetina (QE)/100 g (flavonoidi) te 52,66 mmol Trolox ekvivalenta (TE)/100 g (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) i 26,69 mmol TE/100 g (engl. *2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid*, ABTS). Statistička analiza pokazala je da su temperatura te omjer uzorka i otapala ključni parametri ekstrakcije, dok je najviši prinos fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet postignut u ekstraktu dobivenom pri 60 °C, vremenu ekstrakcije 10 min i omjeru 1:50 g/mL.

Ključne riječi: kora banane, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, niskotemperaturna eutektička otapala, fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 46 stranica, 7 slika, 6 tablica, 81 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ena Cegledi

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Repajić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 21. studenog 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR
BANANA PEEL VALORIZATION

Marija Zorić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058215381

Abstract: The objective of this study was to optimize microwave-assisted extraction (MAE) parameters for isolating phenolic compounds from banana peel and to assess the antioxidant activity of the resulting extracts. A Deep Eutectic Solvent (DES) was used, specifically a mixture of choline chloride and glycerol in a 1:3 ratio with 30 % water (w/w). The effect of temperature (40, 60, and 80 °C), extraction time (5, 10, and 15 min), and sample-to-solvent ratio (1:40, 1:50, and 1:60 g/mL) was evaluated. The extracts were analyzed for total hydroxycinnamic acids, flavonoid content, and antioxidant capacity. Average values were 378.96 mg of chlorogenic acid equivalents (CE)/100 g (hydroxycinnamic acids), 189.69 mg of quercetin equivalents (QE)/100 g (flavonoids), 52.66 mmol of Trolox equivalents (TE)/100 g (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) and 26.69 mmol TE/100 g (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid, ABTS). Statistical analysis identified temperature and sample-to-solvent ratio as crucial extraction parameters, with the highest yield of phenolic compounds and antioxidant activity achieved at 60 °C, a 10-min extraction time, and a 1:50 g/mL ratio.

Keywords: banana peel, microwave-assisted extraction, deep eutectic solvents, phenolic compounds, antioxidant activity

Thesis contains: 46 pages, 7 figures, 6 tables, 81 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Maja Repajić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Ena Cegledi, PhD

Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (president)
2. Maja Repajić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra Balbino, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: November 21st, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BANANA	2
2.1.1. Kora banane	3
2.1.2. Kemijski sastav kore banane	4
2.1.3. Fenolni spojevi kore banane	5
2.1.4. Antioksidacijski kapacitet kore banane	8
2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA	9
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	9
2.3. EUTEKTIČKA OTAPALA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Uzorak kore banane	15
3.1.2. Kemikalije i standardi	15
3.1.3. Aparatura i pribor	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Priprema niskotemperaturnog eutektičkog otapala	19
3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	19
3.2.3. Određivanje ukupnih hidrokscimetnih kiselina	21
3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	23
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	24
3.2.7. Eksperimentalni dizajn i obrada podataka	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA	28
4.2. UDIO UKUPNIH FLAVONOIDA	30
4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	32
4.4. UTJECAJ PARAMETARA MAE NA UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA, UKUPNIH FLAVONOIDA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LIOFILIZIRANE KORE BANANE	34
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Banana (*Musa spp.*) je tropsko voće koje se konzumira širom svijeta zbog svoje slatkoće i nutritivne vrijednosti, a dostupnost tijekom cijele godine čini je jednim od najčešće uzgajanih voća na globalnoj razini. S obzirom na godišnju proizvodnju od oko 130 milijuna t, velika količina kore banane, koja čini oko 30 % ukupne mase ploda, postaje biootpad (Vu i sur., 2018). Iako se često odbacuje, kora banane ima veliki potencijal za valorizaciju. Može se koristiti za proizvodnju bioetanola, aktivnog ugljena te kao izvor pektina u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Osim toga, kora banane bogata je fenolnim spojevima, skupinom sekundarnih biljnih metabolita koji posjeduju snažna antioksidacijska svojstva. Fenolni spojevi, poput flavonoida i fenolnih kiselina, štite biljku od stresa, a u ljudskom organizmu djeluju kao antioksidansi, smanjujući oksidativni stres i pomažući u prevenciji različitih kroničnih bolesti. Zbog njihovih korisnih svojstava, sve veći interes usmjeren je na učinkovitu izolaciju tih spojeva iz različitih biljnih izvora, uključujući koru banane.

Izolacija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala može se provesti konvencionalnim ili naprednim tehnikama ekstrakcije. U ovom radu izolacija fenolnih spojeva provedena je ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (engl. *Microwave-Assited Extraction*, MAE). MAE predstavlja naprednu tehniku ekstrakcije koja omogućuje bržu i učinkovitiju izolaciju bioaktivnih spojeva zahvaljujući upotrebi mikrovalova za zagrijavanje uzorka. Ova metoda značajno smanjuje vrijeme ekstrakcije i potrošnju otapala u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, dok istovremeno minimizira rizik od degradacije osjetljivih spojeva poput fenolnih kiselina i flavonoida (Destandau i Michel, 2022). Primjena ekološki prihvatljivih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) u kombinaciji s MAE dodatno poboljšava učinkovitost ekstrakcije. DES-ovi su nova generacija zelenih otapala, poznata po niskoj toksičnosti i visokoj biorazgradivosti. Njihova fleksibilnost u prilagodbi kemijskih svojstava omogućuje selektivnu izolaciju željenih spojeva, čineći ih idealnim za primjenu u postupcima poput ekstrakcije fenolnih spojeva iz kore banane

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj procesnih uvjeta MAE na izolaciju fenolnih spojeva te posljedično na antioksidacijski kapacitet u ekstraktu kore banane, uz DES (kolin klorid i glicerol (1:3) s 30 % vode, w/w) kao ekstrakcijsko otapalo. Varirani parametri ekstrakcije bili su: temperatura (40, 60 i 80 °C), vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te omjer otapala i biljnog materijala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL). U dobivenim ekstraktima određene su ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavonoidi te antioksidacijski kapacitet pomoću FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i ABTS (engl. *2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid*) metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BANANA

Banana (*Musa* spp.) je jedno od najpopularnijih voća na svijetu, cijenjena zbog svoje nutritivne vrijednosti i važnosti za tropske regije, gdje se tradicionalno uzgaja i značajno doprinosi lokalnim gospodarstvima (Mohd Zaini i sur., 2022). Pripada obitelji *Musaceae*, koja obuhvaća tri roda: *Musa*, *Ensete* i *Musella*, a većina vrsta pripada rodu *Musa*. Gotovo svi identificirani kultivari banana potječu iz dvije diploidne vrste – *Musa acuminata* (A genom) i *Musa balbisiana* (B genom). Raste iz podzemnog rizoma, formirajući lažni trup visok između 3 i 6 m, sastavljen od donjih dijelova listova. Na vrhu trupa smještena je rozeta s 10 do 20 velikih listova, dok iz središta biljke izrasta cvjetna klasica, koja se savija prema dolje i stvara grozdove s 50 do 150 plodova. Nakon što biljka donese jedan grozd, reže se, a iz rizoma svakih šest mjeseci niču novi izdanci, čime se osigurava dug životni ciklus biljke. Na slici 1 prikazan je plod banane koji se sastoji od kore i nutritivno bogate pulpe (Encyclopedia Britannica, 2024).



Slika 1. Plod Cavendish banane (*prema* Augustus Binu, 2015)

Kultivari vrste *M. balbisiana* poznati su kao plantana banane, škrobne banane koje se najčešće koriste za kuhanje i prženje, dok su kultivari vrste *M. acuminata* slatke desertne banane, koje se konzumiraju sirove (Mohd Zaini i sur., 2022). Osim svježe konzumacije, banane se često prerađuju u druge oblike, poput soka, pirea i brašna, što omogućava dulje skladištenje i raznovrsnu primjenu. Također, prženje tankih kriški nezrelih plodova rezultira popularnim čipsom od banane, dok se zreli plodovi mogu jednostavno sušiti i skladištiti bez dodatka konzervansa, čime se produžava njihov rok trajanja (Singh i sur., 2016).

Međutim, nakon iskorištavanja voćne pulpe u prehrambenoj industriji, nastaje velika količina otpada u obliku lišća, pseudostabla, stabljike i kore. Prema podacima FAO-a, 2022. godine

globalna proizvodnja banana iznosila je oko 130 milijuna t. Kora banane čini 30 do 40 % ukupne mase svježeg ploda, što godišnje rezultira s oko 40 milijuna t otpada. Ovo predstavlja ozbiljan izazov za gospodarenje otpadom i sigurno odlaganje (Vu i sur., 2018). Zbog toga se istražuju različite metode iskorištavanja kore banane kako bi se smanjio ekološki otisak i potaknula održivost.

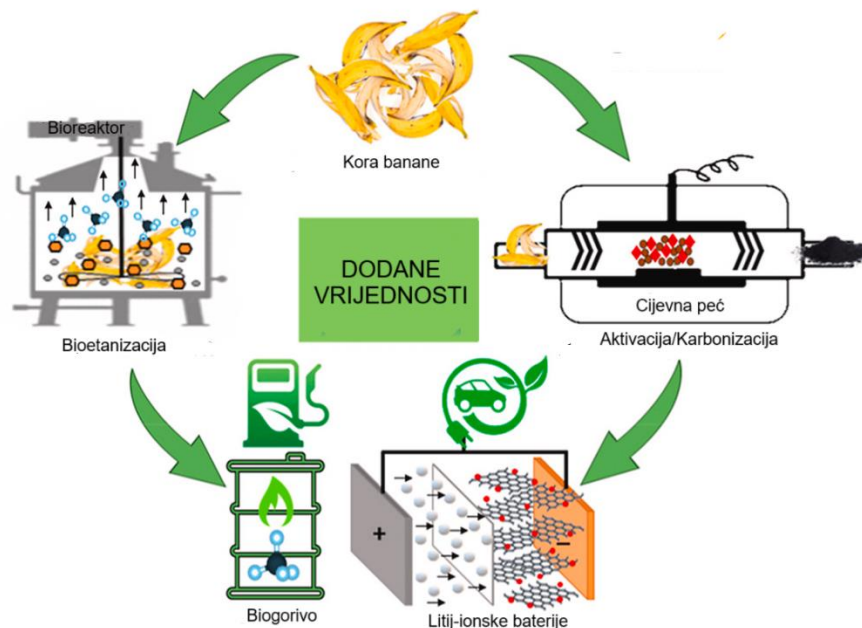
2.1.1. Kora banane

Kora banane već se stoljećima koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje raznih tegoba, poput opeklina, anemije, proljeva, čireva, upala i dijabetesa. Nedavna istraživanja pokazala su da kora banane ima razna farmakološka svojstva, uključujući inhibiciju rasta različitih bakterija i gljivica, snižavanje razine šećera i kolesterola u krvi te sprječavanje razvoja određenih stanica raka (Pereira i Maraschin, 2015; Sirajudin i sur., 2014).

U skladu s načelima cirkularne ekonomije, istražuju se održive primjene kore banane kako bi se smanjio otpad i iskoristile korisne komponente. Jedna od takvih primjena je proizvodnja biogoriva, gdje se fermentabilni šećeri iz kore banane pretvaraju u etanol, odnosno bioetanol, koji može poslužiti kao alternativni izvor energije (Itelima i sur., 2013). Serna-Jimenez i sur. (2021) navode da se proces kemijske aktivacije i karbonizacije kore banane pokazao učinkovitim u dobivanju poroznog aktivnog ugljena (slika 2). Ovaj aktivni ugljen korišten je kao anodni materijal u litij-ionskim baterijama, gdje je pokazao odličan kapacitet i dugotrajnost, što ukazuje na veliki potencijal za daljnju primjenu u baterijskoj industriji. Uz proizvodnju biogoriva i aktivnog ugljena, kora banane može se koristiti za dobivanje mliječne kiseline pomoću starter kulture *Lactobacillus plantarum*. Ova mliječna kiselina, koju je odobrila US FDA (engl. *The United States Food and Drug Administration*), koristi se kao prehrambeni aditiv za produljenje roka trajanja određenih proizvoda (Umesh i Preethi, 2014). Udosen i Enang (2000) navode kako se pepeo kore banane može koristiti kao gnojivo za biljke banane i kao izvor lužine za proizvodnju sapuna zahvaljujući visokom sadržaju minerala. Također, kora banane može poslužiti kao važan izvor pektina, polisaharida koji se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog svojih svojstava zgušnjavanja, stabilizacije i geliranja (Putra i sur., 2022).

Nadalje, Santhoskumar i sur. (2019) otkrili su da se kora banane može koristiti za izradu jestive ambalaže za hranu s poboljšanom otpornošću na razvlačenje. Zahvaljujući sadržaju vlakana i anorganskih hranjivih tvari, ta ambalaža ima slična mehanička svojstva kao polietilen, ali je ekološki prihvatljivija i biorazgradiva. Pod kontroliranim uvjetima kompostiranja, prema standardu ASTM D 5338, potpuno se razgrađuje unutar 45 dana. Ovakve inovativne primjene kore banane ne samo da smanjuju količinu otpada, već i doprinose održivom upravljanju

resursima te stvaranju ekološki prihvatljivih proizvoda, što je važno u kontekstu suvremenih ekoloških izazova.



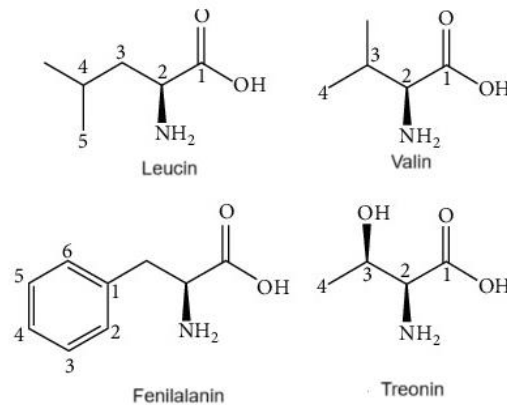
Slika 2. Valorizacija otpada od kore banane kao prekursorskog materijala za različite sustave obnovljive energije (prema Serna-Jimenez i sur., 2021)

2.1.2. Kemijski sastav kore banane

Potencijal kore banane za industrijsku uporabu uvelike ovisi o njenom kemijskom sastavu, koji čini osnovu za različite primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i nutraceutičkoj industriji. Nutritivna vrijednost kore banane varira ovisno o stupnju zrelosti i sorti (González-Montelongo i sur., 2009). Prema istraživanju Hassan i sur. (2018), udio suhe tvari u osušenoj i usitnjenoj kori banane iznosio je 37,67 %, dok je udio proteina bio 1,95 %, masti 5,93 %, vlakana 8,37 %, a ugljikohidrata 11,82 %. Kora banane također je prepoznata kao bogat izvor aminokiselina, poput leucina, valina, fenilalanina i treonina, čija je kemijska struktura prikazana na slici 3. Osim aminokiselina, kora banane sadrži i važne minerale, uključujući fosfor, željezo, kalcij, magnezij i natrij (Mohapatra i sur., 2010).

Posebno se ističe visok sadržaj prehrambenih vlakana, pri čemu dominiraju netopljiva vlakna, poput hemiceluloze, celuloze i lignina. Od topljivih vlakana, najzastupljeniji je pektin, koji čini 15,9 % ukupnih vlakana u kori banane (Pereira i sur., 2020). Osim toga, kora banane predstavlja značajan izvor prirodnih antioksidansa, bogata je bioaktivnim spojevima poput

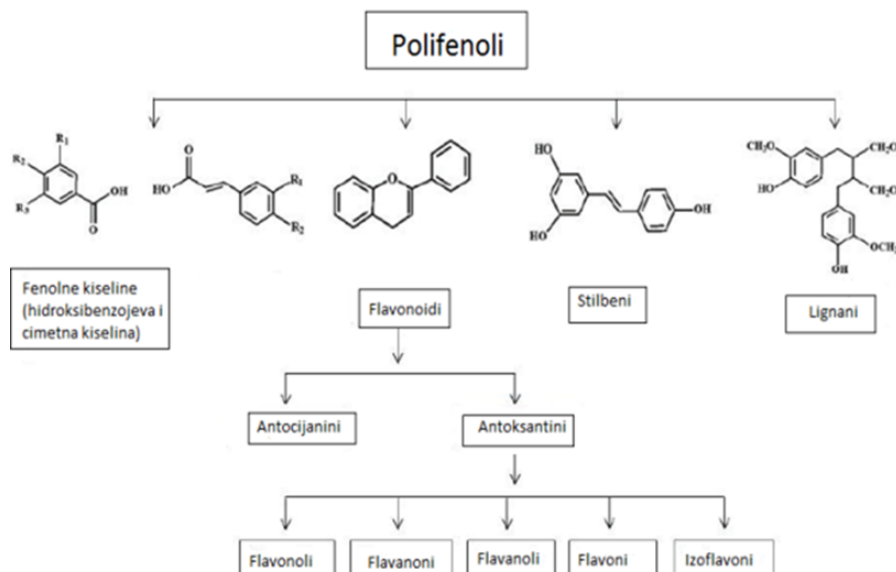
fenolnih kiselina i flavonoida, koji imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Vu i sur., 2018).



Slika 3. Kemijska struktura aminokiselina najzastupljenijih u kori banane (prema Hikal i sur., 2022)

2.1.3. Fenolni spojevi kore banane

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti i jedni su od najzastupljenijih fitokemikalija u biljkama. Razlikuju se po kemijskoj strukturi koja se temelji na aromatskom prstenu s jednom ili više hidroksilnih skupina. U biljkama su ovi spojevi često prisutni u obliku više fenolnih prstenova, zbog čega se nazivaju polifenolima. Fenolne spojeve najčešće dijelimo u četiri skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (slika 4) (Panche i sur., 2016).



Slika 4. Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura (prema Manach i sur., 2004)

Kora banane predstavlja bogat izvor fenolnih spojeva, s ukupnim sadržajem fenola u rasponu od 4,95 do 47 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g suhe tvari (González-Montelongo i sur., 2010). Ova koncentracija je 1,5 do 3 puta veća nego u plodu banane (Sulaiman i sur., 2011). U usporedbi s korama drugih plodova, poput avokada, ananasa, papaje, marakuje, lubenice i dinje, kora banane zauzima drugo mjesto po sadržaju fenolnih spojeva (Morais i sur., 2015).

U kori banane je identificirano više od 40 pojedinačnih fenolnih spojeva, a ti spojevi pripadaju dvjema glavnim podskupinama fenolnih spojeva: flavonoidima i fenolnim kiselinama. Tablica 1 prikazuje neke od glavnih identificiranih fenolnih spojeva u kori banane. Unutar flavonoida, najvažnije podskupine su flavonoli i flavan-3-oli, pri čemu su najzastupljeniji rutin i njegovi derivati. Passo Tsamo i sur. (2015) istraživali su i kvantificirali fenolne spojeve u devet kultivara plantana banana. Otkrili su da su flavonol glikozidi bili dominantni u kori plantana, pri čemu je rutin bio najzastupljeniji, s koncentracijom od 242,2 do 618,7 $\mu\text{g/g}$ suhe tvari. Ostali detektirani spojevi uključivali su derivate s heksozama i strukture bazirane na kvercetinu. S druge strane, unutar fenolnih kiselina, najvažnija podskupina su hidroksicimetne kiseline, od kojih je ferulinska kiselina najzastupljenija. Ove kiseline mogu biti prisutne u slobodnom kiselinskom obliku ili kao derivati sa šećerima, odnosno međusobno povezane (Passo Tsamo i sur., 2015). U istraživanju kojeg su proveli Russell i sur. (2009), detektirane su ferulinska, sinapinska, salicilna, galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska i *p*-kumarinska kiselina kao glavni fenolni spojevi u bananama, pri čemu je ferulinska kiselina bila najzastupljenija, čineći 69 % hidroksicimetnih kiselina u njihovoj analizi.

Na sadržaj i koncentraciju fenolnih spojeva u kori banane mogu utjecati različiti čimbenici, kao što su fiziološke varijacije, uvjeti okoliša, genetski faktori te metoda uzgoja. Na primjer, pokazano je da uvjeti uzgoja značajno utječu na razine bioaktivnih spojeva. Faller i Fialho (2010) otkrili su da su sadržaji topljivih polifenola i hidroliziranih polifenola u kori banane uzgojenoj konvencionalnim metodama bili 38,2 i 14,9 % viši nego u kori uzgojenoj organskim metodama. Zrelost ploda također ima velik utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva. Sazrijevanjem ploda dolazi do smanjenja ukupnog sadržaja fenola. Prezrela kora sadrži 52 % manje fenolnih spojeva, dok zrela kora ima 15-45 % manje fenola u usporedbi sa zelenom korom (Fateme i sur., 2012; Sundaram i sur., 2011). Sličan pad uočen je i u antioksidacijskim svojstvima kore. Istraživanje koju su proveli Vu i sur. (2019a) pokazalo je da se antioksidacijski kapacitet kore povećava kako banana sazrijeva, ali se smanjuje kada postane prezrela, što ukazuje na to da su antioksidacijska svojstva povezana s fenolnim komponentama. Stoga je fazu zrelosti potrebno uzeti u obzir u kontekstu potencijalne uporabe kore banane.

Tablica 1. Identificirani fenolni spojevi u kori banane (prema Mohd Zaini i sur., 2022)

Fenolni spojevi	Kora banane	Količina	Reference
Kamferol	Crvena banana	28,80 µg/g	Avram i sur. (2022)
Izokvercitrin	Žuta banana	9,30 µg/mL	Avram i sur. (2022)
Izokvercitrin	Crvena banana	14,54 µg/mL	Avram i sur. (2022)
Rutin	Žuta banana	10,47 µg/mL	Avram i sur. (2022)
Rutin	<i>Musa paradisiaca</i>	973,08 µg/100 g DE	Behiry i sur. (2019)
Miricetin	<i>Musa paradisiaca</i>	11,52 mg/100 g DE	Behiry i sur. (2019)
Naringenin	<i>Musa paradisiaca</i>	8,47 mg/100 g DE	Behiry i sur. (2019)
Ferulinska kiselina	<i>Musa paradisiaca</i>	1,63 mg/100 g DE	Behiry i sur. (2019)
Cimetna kiselina	Karpooravalli (ABB)	1,93 ng/g	Tallapally i sur. (2020)
α-hidroksicimetna kiselina	Karpooravalli (ABB)	40,66 ng/g	Tallapally i sur. (2020)
Sinapinska kiselina	Karpooravalli (ABB)	10,29 ng/g	Tallapally i sur. (2020)
p-Kumarinska kiselina	Karpooravalli (ABB)	8,05 ng/g	Tallapally i sur. (2020)
Dopamin	Grande Naine (AAA)	1,72 mg/g DM	González-Montelongo i sur. (2010)
Dopamin	Gruesa (AAA)	1,17 mg/g DM	González-Montelongo i sur. (2010)
L-Dopa	Grande Naine (AAA)	0,31 mg/g DM	González-Montelongo i sur. (2010)
L-Dopa	Gruesa (AAA)	0,56 mg/g DM	González-Montelongo i sur. (2010)

DE označava suhi ekstrakt, DM označava suhu tvar

2.1.4. Antioksidacijski kapacitet kore banane

Antioksidansi su spojevi koji u hrani čak i u niskim koncentracijama mogu kontrolirati, usporiti ili spriječiti oksidativne procese koji vode do smanjenja kvalitete hrane, dok kada su prisutni u ljudskom tijelu sprječavaju nastanak i širenje degenerativnih bolesti (Shahidi i Zhong, 2015). Imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, čime prekidaju lančane reakcije tih radikala i sprječavaju njihovo daljnje štetno djelovanje (Romera-Castillo i Jaffé, 2015). Metode kojima se najčešće uklanjaju slobodni radikali temelje se na dva mehanizma: prijenosu vodikovog atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i na prijenosu pojedinačnog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*, SET). Najčešće korištene SET metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) i ABTS (prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina, dok u HAT metode ubrajamo ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), DPPH (prema radikalu 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil), TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), β -karoten (metoda koja se temelji na izbjeljivanju β -karotena) i SASA (engl. *Scavenging of Superoxide Radical Formation by Alkaline*) (Prior i sur., 2005).

Antioksidacijski potencijal ploda banane rezultat je prisutnosti bioaktivnih spojeva, od kojih su najzastupljeniji fenoli, karotenoidi i askorbinska kiselina. Brojne studije pokazale su da je antioksidacijski kapacitet kore banane povezan s visokim udjelom ukupnih fenolnih spojeva. Također, istraživanja su otkrila da ekstrakti kore banane imaju snažniju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s pulpom (Singh i sur., 2016). Antioksidacijski potencijal kore banane pripisuje se i biogenim aminima poput dopamina i L-DOPA, koji posjeduju antioksidacijska svojstva. Njihova količina se neznatno smanjuje tijekom sazrijevanja, ali ostaje na značajnim razinama u svim fazama sazrijevanja (Kanazawa i Sakakibara, 2000). Morais i sur. (2015) određivali su antioksidacijski kapacitet u ekstraktima avokada, ananasa, banane, papaje, marakuje, lubenice i dinje. Antioksidacijski kapacitet mjerili su pomoću FRAP i DPPH metoda. Rezultati su pokazali kako je avokado imao višu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta od banane, no banana je ipak nadmašila svo ostalo voće s dobivenim vrijednostima određenim FRAP i DPPH metodama. Hernández-carranza i sur. (2016) također su određivali antioksidacijski kapacitet u različitom voću pomoću DPPH i FRAP metoda. Najviše vrijednosti zabilježene su u kori banane u usporedbi s kominom jabuke i korom naranče. Dobivena vrijednost za DPPH metodu iznosila je od 597 do 1040 mg Troloxa/100 g suhe tvari, dok je za FRAP metodu iznosila od 8,9 do 32,2 mM Fe^{2+} /100 g suhe tvari. Nešto više vrijednosti određene DPPH metodom u ekstraktima kore banane dobili su González-Montelongo i sur. (2010). Raspon vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta iznosio je od 250 mg do 3200 mg Troloxa/100 g suhe tvari.

2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA

Ekstrakcija je već dugo poznata tehnika za brzo i učinkovito razdvajanje i koncentriranje tvari. Ona predstavlja fizikalni proces kod kojeg zbog koncentracijskog gradijenta dolazi do difuzije spojeva iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012). Na učinkovitost ekstrakcije utječu čimbenici poput veličine čestica uzorka, odabira otapala i njegovih svojstava, kao i omjera otapala i uzorka te uvjeta poput vremena i temperature ekstrakcije. S obzirom na te varijable, ne postoji jedna univerzalna tehnika ekstrakcije prikladna za sve vrste bioaktivnih spojeva (Teixeira i sur., 2014).

Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala koriste se različite konvencionalne i napredne tehnike ekstrakcije. Među najčešćim konvencionalnim tehnikama su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i vodena destilacija. Ove tehnike uglavnom se oslanjaju na pravilan izbor otapala te korištenje topline kako bi se povećala topljivost spojeva i prijenos mase, često zahtijevajući ručni rad. Iako su ove tehnike popularne zbog jednostavnosti i niskih troškova, njihov nedostatak uključuje ograničen prinos, veliku potrošnju otapala, dugotrajnost procesa, nakupljanje ostataka i rizik od toplinske razgradnje komponenti (Alara i sur., 2021).

Kako bi se prevladali nedostaci konvencionalnih tehnika, došlo je do razvoja i uporabe naprednih tehnika kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasonic-assisted extraction*; UAE), ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (engl. *pressurized liquid extraction*; PLE), ekstrakcija superkričnim tekućinama (engl. *supercritical fluid extraction*; SFE) te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*; MAE) (Shams i sur., 2015). Prednosti naprednih metoda ekstrakcije uključuju veću učinkovitost, smanjenu potrošnju ekstrakcijskog otapala, kraće vrijeme ekstrakcije te mogućnost provođenja ekstrakcije na nižim temperaturama što doprinosi održavanju vrijednih bioaktivnih spojeva. Iako napredne tehnike ekstrakcije pokazuju značajan potencijal, potrebno je prepoznati postojeće izazove i ograničenja, poput standardizacije, optimizacije, skalabilnosti i ekonomske održivosti (Usman i sur., 2023).

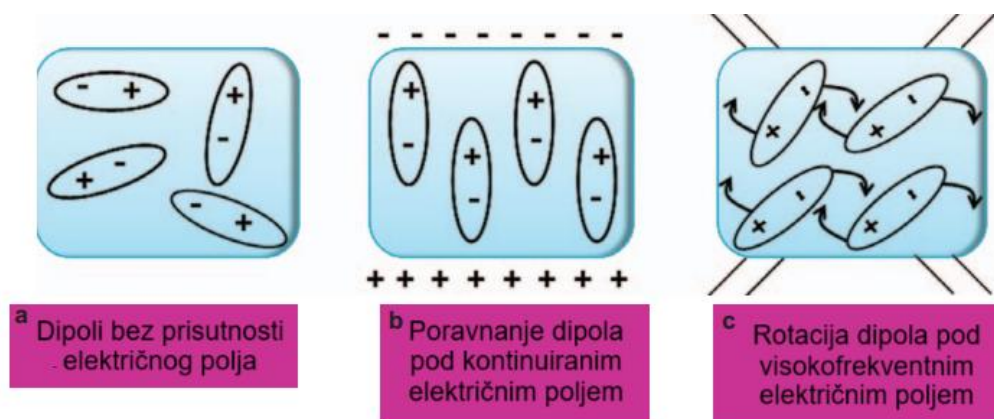
2.6.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Zbog sve većeg fokusa na zelene tehnologije, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) smatra se jednom od obećavajućih metoda te se sve više koristi kao ključna tehnika za izdvajanje vrijednih spojeva iz biljnog materijala (Destandau i Michel, 2022).

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi s frekvencijama u rasponu od 300 MHz do 300 GHz i valnih duljina između 1 m i 1 mm. Sastavljeni su od dva oscilirajuća okomita

polja: električnog i magnetskog polja te se mogu koristiti kao prijenosnici informacija ili kao energetske vektori. Uloga energetskih vektora odnosi se na izravno djelovanje valova na materijal koji je sposoban apsorbirati dio elektromagnetske energije i pretvoriti je u toplinu (Wang i Weller, 2006).

Princip zagrijavanja mikrovalova temelji se na izravnim učincima mikrovalova na molekule materijala. Pretvorba elektromagnetske energije u toplinsku energiju odvija se kroz dva mehanizma: ionsku vodljivost i rotaciju dipola u otapalu i uzorku, koji često djeluju istovremeno (Eskilsson i Björklund, 2000). Ionska vodljivost se manifestira kroz migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja, pri čemu otopina pruža otpor, što rezultira trenjem, a time i zagrijavanjem otopine (Ganzler i sur., 1990). S druge strane, rotacija dipola povezana je s izmjeničnim kretanjem polarnih molekula koje imaju dipolne momente (bilo trajne ili inducirane električnim poljem) koji se pokušavaju uskladiti s nametnutim električnim poljem (slika 5). Kako se električno polje smanjuje, tako se povećava entropija sustava što rezultira oslobađanjem topline (Camel, 2000). Što je veći dipolni moment molekule, to je jača oscilacija u mikrovalnom polju. Ova rotacija dipola dovodi do prekida slabih vodikovih veza (Kaufmann i Christen, 2002).



Slika 5. Ponašanje dipolnih molekula: (a) bez električnog polja, (b) pod kontinuiranim električnim poljem i (c) pod visokofrekventnim električnim poljem (prema Destandau i Michel, 2022)

Jedno od bitnih svojstava mikrovalova je faktor rasipanja ($\tan \delta$) koji predstavlja mjeru sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i u obliku topline ju prenosi na okolne molekule (Mandal i sur., 2007). Polarna otapala, poput vode, imaju visoku dielektričnu konstantu što omogućuje da snažno apsorbiraju energiju mikrovalova. Nasuprot tome, nepolarna otapala, poput heksana, neće se zagrijavati kada su izložena mikrovalovima i nazivaju se mikrovalno prozirnim otapalima (Eskilsson i Björklund, 2000). Osim selektivnosti, mikrovalno zagrijavanje ima još jednu specifičnost – za razliku od klasičnog konduktivnog zagrijavanja, ono djeluje volumetrijski, što znači da se cijeli uzorak zagrijava istovremeno. Kod

konduktivnog zagrijavanja toplina se prenosi s površine prema unutra, dok se kod mikrovalnog zagrijavanja toplina stvara u središtu smjese, stvarajući obrnut temperaturni gradijent (Camel, 2001).

MAE se može provoditi u dva tipa uređaja: u zatvorenim sustavima s kontroliranim tlakom i temperaturom ili u otvorenim sustavima koje rade na atmosferskom tlaku (Mandal i sur., 2007). U zatvorenom sustavu, ekstrakcija se odvija unutar posude u kojoj se reguliraju tlak i temperatura. Mogućnost povišenja tlaka omogućuje ekstrakciju na temperaturama višim od vrelišta korištenog otapala, što je posebno korisno za izolaciju termostabilnih spojeva. Ekstrakcija se obično provodi pri temperaturama koje su dva do tri puta više od vrelišta otapala, dok se u otvorenim sustavima postupak odvija pri atmosferskom tlaku i temperaturi vrelišta otapala (Uzel, 2018).

Osim odabira uređaja, na proces ekstrakcije utječu i drugi parametri poput snage mikrovalova, temperature, trajanja procesa i izbora otapala.

Utjecaj snage mikrovalova

Snaga mikrovalova značajno utječe na brzinu i prinos ekstrakcije. Povećanjem snage dolazi do bržeg zagrijavanja uzorka, što uzrokuje pucanje staničnih membrana i olakšava otapalu pristup staničnom sadržaju. Ipak, pretjerano povećanje snage može dovesti do pregrijavanja i uništenja stanica, što smanjuje ekstrakcijski prinos (Routray i Orsat, 2011). Stoga je ključno pažljivo odabrati odgovarajuću snagu mikrovalova kako bi se optimizirala učinkovitost procesa.

Utjecaj temperature

Temperatura je usko povezana sa snagom mikrovalova, jer veća snaga rezultira višim temperaturama, što povećava učinkovitost ekstrakcije. Povišene temperature poboljšavaju prodornost otapala, povećavaju topljivost komponenata te smanjuju viskoznost i površinsku napetost. U zatvorenim MAE sustavima temperatura može prelaziti vrelište otapala, što dodatno povećava prinos. Međutim, povišenje temperature rezultirati će većim ekstrakcijskim prinosom dok se ne postigne optimalna temperatura. Nakon tog, dolazi do pada vrijednosti ekstrakcijskog prinosa na što uvelike utječe kemijska struktura komponenata koje se ekstrahiraju te njihova termička stabilnost pri različitim temperaturama (Routray i Orsat, 2011; Veggi i sur., 2012).

Utjecaj vremena ekstrakcije

Vrijeme trajanja ekstrakcije kod MAE značajno je kraće u usporedbi s konvencionalnim tehnikama. Iako dulje vrijeme može povećati prinos, ono također povećava rizik od degradacije spojeva. Da bi se spriječilo pregrijavanje i termička razgradnja uzorka, trajanje ekstrakcije treba pažljivo prilagoditi snazi mikrovalova (Mandal i sur., 2007).

Utjecaj otapala:

Pravilan izbor otapala ključan je za učinkovitost MAE, a ovisi o topljivosti ciljanih spojeva, dielektričnim svojstvima otapala, interakciji s uzorkom te kinetici prijenosa mase. Otapalo mora biti sposobno apsorbirati mikrovalnu energiju i pretvoriti je u toplinu. Otapala koja ne apsorbiraju mikrovalnu energiju, poput heksana, nisu prikladna, jer ne zagrijavaju uzorak (Eskilsson i Björklund, 2000). Polarna i nepolarna otapala mogu se kombinirati kako bi se optimizirala selektivnost za različite spojeve, što povećava učinkovitost ekstrakcije (Veggi i sur., 2012).

MAE nudi brojne prednosti u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije. Glavne prednosti uključuju kraće vrijeme ekstrakcije i značajno manju potrošnju otapala. Za razliku od konvencionalnih metoda, gdje se velik dio toplinske energije gubi i odlazi u okoliš, kod upotrebe mikrovalova dolazi do ciljanog i selektivnog zagrijavanja, zbog čega nema gubitka topline. Nadalje, MAE omogućuje potpunu kontrolu parametara poput vremena, snage i temperature, čime se povećava reproducibilnost postupka. Međutim, MAE ima i neka ograničenja. Mikrovalno zračenje može ubrzati kemijske reakcije i promijeniti kemijsku strukturu ciljanih spojeva, što smanjuje prinos ekstrakcije. Također, njezina učinkovitost može biti smanjena za nepolarne spojeve ili otapala (Destandau i Michel, 2022).

2.3. EUTEKTIČKA OTAPALA

Kako bi se smanjio negativan utjecaj konvencionalnih otapala na ljudsko zdravlje i okoliš, znanstvenici su razvili niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES). DES-ovi su klasificirani kao nova generacija ionskih kapljevina. Ionske kapljevine (engl. *Ionic Liquids*, IL) također su razvijene kao alternativa klasičnim organskim otapalima te se definiraju kao soli koje pri sobnoj temperaturi ostaju u tekućem stanju. Njihova posebnost leži u mogućnosti prilagođavanja fizikalno-kemijskih svojstava kombiniranjem različitih kationa i aniona (Rogers i Seddon, 2003). Iako su našle široku primjenu, jedno od glavnih ograničenja ionskih kapljevina je njihov potencijalno negativan utjecaj na okoliš zbog njihove slabe

biorazgradivosti i neodrživosti. Za razliku od ionskih kapljevina, DES-ovi su poznati po manjoj toksičnosti i često su biorazgradivi, dok zadržavaju slična svojstva kao ionske kapljevine. DES-ovi se mogu definirati kao smjesa dviju ili više komponenti koja ima značajno nižu točku tališta nego svaka komponenta pojedinačno (Paiva i sur., 2014).

DES-ovi nastaju interakcijom između donora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) i akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), što uzrokuje delokalizaciju naboja i posljedično značajno smanjenje točke tališta (Sekharan i sur., 2022). U usporedbi s ionskim kapljevina, DES-ovi su pogodniji, jer su relativno jeftini za pripremu, postoji širok raspon spojeva koji se mogu koristiti kao gradivne komponente, a čistoća konačnog produkta ovisi isključivo o čistoći upotrijebljenih sirovina, bez potrebe za dodatnim postupcima pročišćavanja (Carriazo i sur., 2012). DES-ovi su prvi put predloženi kao zamjena za ionske kapljevine u radu Abbott i sur. (2004), gdje je istražen DES s kolin-kloridom kao donorom vodikove veze. Kolin-klorid je jedan od najčešće korištenih spojeva u pripremi DES-ova, a u kombinaciji s njim često se koriste urea, limunska kiselina, glicerol i slični spojevi. Neke od struktura supstrata korištenih za sintezu eutektičkih otapala prikazane su na slici 6. DES-ovi na bazi kolin-klorida prvo su se primjenjivali u elektrotaloženju, elektropoliranju metala i u proizvodnji biodizela. Nakon toga, DES-ovi se primjenjuju i kao otapala u organskoj sintezi, biokatalizi, elektrokemiji i ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).



Slika 6. Kemijska struktura različitih spojeva koji se mogu koristiti za pripremu DES-ova (prema Paiva i sur., 2014)

U posljednjih nekoliko godina, DES-ovi su pokazali značajan napredak u ekstrakciji različitih polarnih i nepolarnih bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. Zhang i sur. (2014) izvijestili su o uspješnoj ekstrakciji triju katehina iz zelenog čaja korištenjem DES-a na bazi kolin-klorida, dok su Wang i sur. (2019) dokazali da DES na bazi poliola (kolin-klorid/1,4-butanediol) učinkovito ekstrahira flavonoide iz biljke *Sophora japonica* L. Slična istraživanja provedena su i od strane Jianga i sur. (2019), gdje su ispitani različiti DES-ovi za ekstrakciju alkaloida iz biljnih materijala.

Glavni izazov u korištenju DES-ova u odnosu na konvencionalna otapala je njihova visoka viskoznost, koja otežava učinkovit prijenos mase tijekom ekstrakcije. Ovaj problem može usporiti cijeli proces ekstrakcije. Budući da na viskoznost utječu temperatura i udio vode (pri višim temperaturama viskoznost se smanjuje), ovaj nedostatak može se ublažiti dodavanjem određene količine vode (Dai i sur., 2013; Durand i sur., 2013). Istraživanje koje su proveli Dai i sur. (2013) pokazalo je da DES-ovi imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva iz šafranike, zahvaljujući stvaranju vodikovih veza između molekula otapala i fenolnih spojeva. Optimizacijom parametara poput viskoznosti, polarnosti i temperature, zabilježen je veći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva u usporedbi s konvencionalnim otapalima poput vode i etanola. Primjena DES-ova pokazuje značajan potencijal u ekstrakciji bioaktivnih molekula, što ih čini idealnim za upotrebu u prehrambenoj, kozmetičkoj, agrokemijskoj i farmaceutskoj industriji (Paiva i sur., 2014; Dai i sur., 2013)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje procesnih uvjeta MAE (temperatura, vrijeme ekstrakcije te omjer otapala i biljnog materijala) za izolaciju fenolnih spojeva iz kore banane uz DES (mješavina kolin klorid i glicerola (1:3) s 30 % vode (w/w)) kao ekstrakcijsko otapalo. U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonoida i antioksidacijski kapacitet.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak kore banane

Kao materijal za provođenje eksperimentalnog dijela korišteni su komercijalno dostupni uzorci banane (*M. acuminata*) sorte Cavendish, kupljeni na lokalnoj tržnici u Zagrebu (Hrvatska). Za provedbu eksperimentalnog dijela, kora banane je ručno odvojena, zamrznuta pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a potom liofilizirana 48 h pri $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Liofilizirana kora banane je zapakirana u hermetički zatvorene polietilenske vrećice i skladištena pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do postupka ekstrakcije. Neposredno prije ekstrakcije, liofilizirana kora banane je usitnjena električnim mlinцем.

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Kolin klorid (Biovit d.o.o., Jalkovec, Hrvatska)
- Glicerol (Biovit d.o.o., Jalkovec, Hrvatska)
- Destilirana voda
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- 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, 99 %-tni (Honeywell, Riedel-de-Haën, Bukurešt, Rumunjska)
- 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, Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330 μ 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, Zagreb, Hrvatska)
- 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, Val de Reuil, Francuska)
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6
Priprema: odvaži 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 odvaži 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, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$
Priprema: 0,1892 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ izvaži 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 μL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva pri sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ pri tome je 2,45 mmol/L.
- na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+
Priprema: 1000 μL 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.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga AX224 (Ohaus, Parsippany, SAD)
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g) (Mettler Toledo, SAD)
- Vortex uređaj MS2 Minishaker IKA (IKA, Staufen, Njemačka)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE Ethos Easy, Sorisole (BG), Italija)
- Električni mlinac (Waring WSG30, Sprzęt Laboratoryjny i Medyczny Labpartner KBS, Poljska)
- Sušionik (Heratherm OMH100, Thermo Scientific, Dreieich, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, Pennsylvania, SAD)
- Liofilizator Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Magnetska miješalica s grijanjem RT 5 power (IKA Werke, Staufen, Njemačka)

Pribor:

- Plastične kivete (Falcon), volumena 50 mL
- Pipete, volumena 1, 2, 5, 10 i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 5, 100 i 1000 mL
- Menzura, volumena 50, 100 i 1000 mL
- Staklene čaše, volumena 25, 50, 100 200 i 500 mL
- Stakleni lijevci
- Filter papiri
- Plastična žličica
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100, 1000 i 5000 μ L
- Staklene boce
- Nastavci za mikropipete Eppendorf
- Erlenmeyerova tikvica
- Ekstrakcijske ćelije
- Magnetni štapić
- Magnetni za miješanje
- Kivete za spektrofotometriju

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema niskotemperaturnog eutektičkog otapala

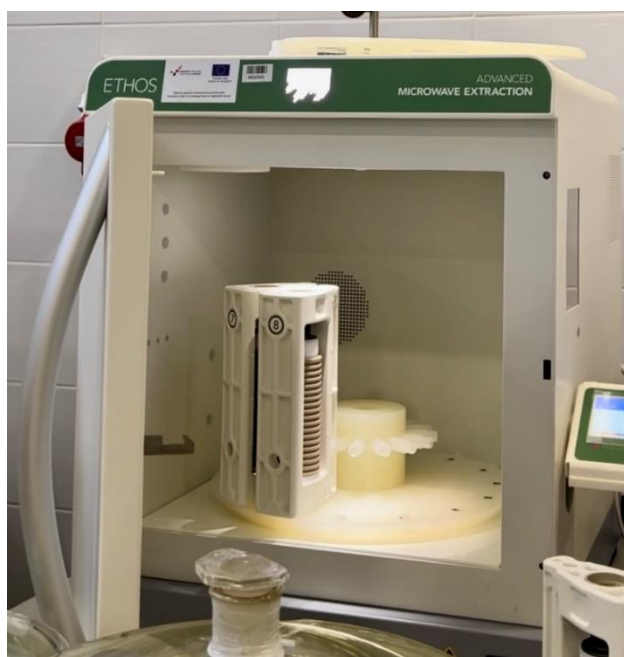
U laboratorijsku čašu pomiješa se kolin-klorid i glicerol u omjeru 1:3 s 30 % vode (w/w). Magnet se doda u čašu, koja se zatim postavi na magnetsku miješalicu pri 50 °C te se provodi miješanje sve dok se nije dobila homogena, bistra tekućina.

3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Izolacija fenolnih spojeva iz liofilizirane kore banane provedena je primjenom MAE uz upotrebu DES-a (kolin klorid i glicerola (1:3) s 30 % vode (w/w)) kao ekstrakcijskog otapala. U svrhu utvrđivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije s ciljem postizanja najvišeg prinosa fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta dobivenih ekstrakata, varirani su parametri: temperatura (40, 60 i 80 °C), vrijeme (5, 10 i 15 min) te omjer otapala i uzroka (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL). Detaljan plan eksperimenta prikazan je u tablici 2.

Postupak ekstrakcije:

Odvaži se određena masa usitnjenog uzorka prema planu eksperimenta (prema zadanom omjeru čvrste i tekuće tvari (g/mL): 1:20 = 2,5 g; 1:40 = 1,25 g; 1:60 = 0,83 g) u ćeliju ekstraktora i homogenizira se s 40 mL otapala za ekstrakciju. Potom se u svaku ćeliju ubaci magnetni mješač te se ćelije postave na rotor reaktora (slika 7).



Slika 7. Mikrovalni reaktor MILESTONE Ethos Easy (*vlastita fotografija*)

Na mikrovalnom ekstraktoru, postave se parametri temperature i vremena ekstrakcije prema prikazu u tablici 2 te snaga mikrovalova 400 W. Osim toga, postavlja se snaga miješanja 50 %, vrijeme zagrijavanja do željene temperature 2 min za 40 °C, 4 min za 60 °C, 6 min za 80 °C, ventilacija i hlađenje nakon ekstrakcije 2 min, a temperatura se održava konstantnom tijekom postupka ekstrakcije. Nakon završene ekstrakcije, uzorci se kvantitativno prenesu u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i do oznake nadopune ekstrakcijskim otapalom. Pripremljeni uzorci prebace se u plastične epruvete (Falcon) i dobro zatvore. Ekstrakti se skladište pri +4 °C te se koriste za određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te antioksidacijskog kapaciteta FRAP i ABTS metodama.

Tablica 2. Plan eksperimenta izolacije fenolnih spojeva iz liofilizirane kore banane primjenom MAE

Br. uzorka	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Omjer uzorka i otapala (g/mL)
1	40	5	1:40
2		10	
3		15	
4	60	5	
5		10	
6		15	
7	80	5	
8		10	
9		15	
10	40	5	1:50
11		10	
12		15	
13	60	5	
14		10	
15		15	
16	80	5	
17		10	
18		15	
19	40	5	1:60
20		10	
21		15	
22	60	5	
23		10	
24		15	
25	80	5	
26		10	
27		15	

3.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Princip metode

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta koristi otapalo za ekstrakciju. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Izrada baždarnog pravca

Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1; 2,5; 5 i 6,67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 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 (CE)/100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 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. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta koristi otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 min, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda pripremaju se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 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. Na isti se način pripremi i slijepa proba, 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 stoji potom 30 min, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

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

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

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L)

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

3.2.5. 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-tripiridiltriazin 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. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Priprema uzoraka

Ekstrakte kore banane potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom 30 puta.

Postupak određivanja

Za mjerenje apsorbancije uzoraka u svrhu određivanje antioksidacijskog kapaciteta potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 30 min pri 37 °C u mraku. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjerneju 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 μL destilirane vode, 80 μL otopine Troloxa određene koncentracije i 2080 μL 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 μL 96 %-tnog etanola. Slijedi mjerenje apsorbancije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi 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]:

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

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

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom izražen je u mmol TE/100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. 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 30 puta.

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

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 0,02 mol/L standardna otopina Troloxa na način da se u plastičnoj ladici izvaže 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 µmol/L pipetiranjem redom 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 nacrtava se baždarni pravac tako što 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 (µmol/L)

R² – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom izražen je u mmol TE/100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.7. Eksperimentalni dizajn i obrada podataka

Statistička analiza je provedena korištenjem softvera Statistica verzija 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Eksperimentalni dizajn pokusa dizajniran je kao puni faktorijski dizajn koji je uključivao 27 pokusa. Svaka ekstrakcija i analiza provedena je u duplikatu. Nezavisne varijable bile su temperatura, vrijeme ekstrakcije te omjer uzorka i otapala, a zavisne varijable bile su udio ukupnih hidrokscimernih kiselina, udio ukupnih flavonoida te antioksidacijski kapacitet mjeran ABTS i FRAP metodama. Dobivenim podacima i rezidualima testirani su normalnost i homoskedastičnost primjenom Shapiro-Wilk-ovog i Levene-ovog testa. Na temelju ovih procjena, podaci su analizirani pomoću multifaktorske analize varijance (ANOVA) praćene Tukeyjevim HSD *post-hoc* testom ili neparametrijskim Kruskal-Wallis-ovim testom s višestrukim usporedbama srednjih rangova. Razina značajnosti za sve testove postavljena je na $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje uvjeta MAE za izolaciju fenolnih spojeva i određivanje antioksidacijske aktivnosti kore banane uz upotrebu mješavine kolin klorida i glicerola (1:3) s 30 % vode (w/w) kao ekstrakcijskog otapala. Varirani parametri ekstrakcije bili su: temperatura (40, 60 i 80 °C), vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te omjer otapala i uzorka (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL). Proizvedeno je 27 ekstrakata koji su korišteni u spektrofotometrijskim analizama za određivanje udjela ukupnih hidrosicimetnih kiselina, ukupnih flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta FRAP i ABTS metodama.

Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu i prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka provedeni su u programu Statistica 10.0, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih hidrosicimetnih kiselina određenih u ekstraktima liofilizirane kore banane dobivenih primjenom MAE prikazani su u tablici 3 rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih flavonoida određenih u ekstraktima liofilizirane kore banane dobivenih primjenom MAE prikazani su u tablici 4, dok je u tablici 5 prikazan antioksidacijski kapacitet određen FRAP i ABTS metodama. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih hidrosicimetnih kiselina, udio ukupnih flavonoida te antioksidacijski kapacitet određen FRAP i ABTS metodama prikazani su u tablici 6.

4.1. UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA

Tablica 3. Udio ukupnih hidrosicimetnih kiselina izražen u mg ekvivalenata klorogenske kiseline (CE) u ekstraktima liofilizirane kore banane dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

BROJ UZORKA	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA (mg CE/100 g)
1	40	5	1:40	287,68±20,20
2		10		316,77±4,85
3		15		326,46±28,28
4	60	5		263,57±0,81
5		10		325,89±12,93
6		15		323,24±12,13
7	80	5		190,53±8,89
8		10		191,04±14,54
9		15		248,21±11,31
10	40	5	1:50	276,58±9,09
11		10		334,50±10,10
12		15		359,57±1,01
13	60	5		370,10±30,29
14		10		369,57±15,15
15		15		330,74±3,03
16	80	5		291,54±2,02
17		10		284,57±2,02
18		15		204,49±18,18
19	40	5	1:60	282,48±2,43
20		10		337,57±7,30
21		15		359,94±21,90
22	60	5		365,19±14,60
23		10		378,96±12,17
24		15		341,87±13,38
25	80	5		253,33±9,74
26		10		278,28±20,69
27		15		326,51±20,69

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u uzorcima ekstrakata liofilizirane kore banane određen je u rasponu od $190,53 \pm 0,89$ do $378,96 \pm 1,22$ mg CE/100 g. Najniža vrijednost ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježena je u uzorku broj 7, koji je ekstrahiran pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL, dok je najviša vrijednost određena u uzorku broj 23, koji je ekstrahiran pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, vremenu ekstrakcije 10 min i omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Passo Tsamo i sur. (2015) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore banane koristeći vodenu kupelj uz smjesu aceton:voda (50:49:1, v:v) s dodatkom 0,2 mM askorbinske kiseline kao ekstrakcijsko otapalo. U uzorcima ekstrakata kore banane zabilježili su vrijednosti udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina u rasponu od $8,14 \pm 0,29$ do $21,3 \pm 6,14$ mg/100 g. Sličan raspon vrijednosti udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježili su Ongphimai i sur. (2013) u svom radu, gdje su proveli Soxhlet ekstrakciju na različitim vrstama voća (naranča, guava, mango i banana), pri čemu su u uzorcima ekstrakata banane zabilježili raspon vrijednosti udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 0,59 do 21,95 mg/100 g. Nešto niže vrijednosti zabilježili su Russell i sur. (2009.), koji su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva iz banane koristeći etil-acetat. U njihovom istraživanju, koje je obuhvatilo voće lokalno proizvedeno u Škotskoj, uključujući bananu, udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima banane iznosio je od 0,655 do 4,862 mg/100 g.

Usporedbom navedenih vrijednosti s rezultatima dobivenim u ovom rada, primjećuju se određene razlike te se može primjetiti kako je MAE u kombinaciji s DES-om rezultirala višim vrijednostima udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Razlog tome može biti taj što je MAE poznata po brzom zagrijavanju, koje razbija stanične stijenke, omogućujući brže oslobađanje bioaktivnih spojeva. Osim toga, kraće trajanje ekstrakcije smanjuje rizik od degradacije spojeva osjetljivih na toplinu, dok selektivno zagrijavanje poboljšava topljivost fenolnih spojeva. Ova metoda također zahtijeva manje otapala, čineći je ekološki prihvatljivijom (Veggie i sur., 2012). DES-ovi, s druge strane, stvaraju snažne vodikove veze s fenolnim spojevima, poboljšavajući njihovu topljivost i stabilnost tijekom procesa ekstrakcije. Zahvaljujući svojoj prilagodljivoj polarnosti, DES-ovi učinkovitije razgrađuju staničnu stijenkiju biljaka, omogućujući lakše oslobađanje fenola te postižu bolje rezultate u usporedbi s konvencionalnim otapalima poput etanola ili metanola (Alam, 2021).

4.2. UDIO UKUPNIH FLAVONOIDA

Tablica 4. Udio ukupnih flavonoida izražen u mg ekvivalenta kvercetina (QE) u ekstraktima liofilizirane kore banane dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

BROJ UZORKA	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	UDIO UKUPNIH FLAVONOIDA (mg QE/100 g)
1	40	5	1:40	108,30±6,56
2		10		141,03±5,33
3		15		147,11±0,82
4	60	5		133,75±0,82
5		10		172,32±10,25
6		15		145,46±9,02
7	80	5		96,70±4,92
8		10		128,84±6,15
9		15		152,92±10,66
10	40	5	1:50	123,71±5,12
11		10		141,49±2,56
12		15		136,45±5,64
13	60	5		153,76±4,61
14		10		179,20±5,64
15		15		176,89±13,82
16	80	5		145,78±6,66
17		10		147,68±9,22
18		15		104,52±1,54
19	40	5	1:60	133,78±6,79
20		10		150,81±3,70
21		15		152,99±10,49
22	60	5		189,69±9,26
23		10		151,72±3,70
24		15		152,99±3,09
25	80	5		122,91±3,70
26		10		158,70±7,41
27		15		178,37±0,62

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

Udio ukupnih flavonoida u uzorcima ekstrakata liofilizirane kore banane određen je u rasponu od $96,70 \pm 4,92$ do $189,69 \pm 9,26$ mg QE/100 g. Najniža vrijednost ukupnih flavonoida određena je u uzorku broj 7, koji je ekstrahiran pri $80\text{ }^\circ\text{C}$, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL, dok je najviša vrijednost određena u uzorku broj 22, koji je ekstrahiran pri $60\text{ }^\circ\text{C}$, vremenu ekstrakcije 5 min i omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Bashmil i sur. (2021) proveli su maceraciju koristeći 70 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo kako bi karakterizirali koru šest australskih kultivara banana u različitim fazama zrenja u smislu njihovih fenolnih spojeva. Udio ukupnih flavonoida određen je u rasponu od 0,10 mg do 3,00 mg QE/100 g. Usporedbom rezultata dobivenih u ovom radu s rezultatima Bashmil i sur. (2021), vidljive su više vrijednosti dobivene primjenom MAE uz DES kao ekstrakcijsko otapalo, što ukazuje na to da je kombinacija MAE i DES-a učinkovitija za ekstrakciju flavonoida iz kore banane u odnosu na maceraciju s etanolom. Ova veća učinkovitost može se pripisati sposobnosti DES-ova da formiraju stabilne vodikove veze s hidroksilnim grupama flavonoida, čime se prekidaju međumolekulske vodikove veze unutar flavonoida. Time DES-ovi povećavaju topljivost i interakciju flavonoida s otapalom, što rezultira većim prinosom flavonoida u usporedbi s konvencionalnim otapalima poput etanola (Alam i sur., 2021).

Putri i sur. (2023) su odredili udio ukupnih flavonoida u kori banane koristeći UAE pri $45\text{ }^\circ\text{C}$, vremenu ekstrakcije 45 min te omjeru uzorka i otapala 1:10, 1:20 i 1:30 g/mL uz 50, 70 i 96 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo. U uzorcima koji su ekstrahirani uz 50 %-tnu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo zabilježene su vrijednosti udjela ukupnih flavonoida u rasponu 111,66-155,48 mg QE/100 g, zatim u uzorcima koji su ekstrahirani uz 70 %-tnu vodenu otopinu etanola 116,39-165,59 mg QE/100 g te u uzorcima koji su ekstrahirani uz 96 %-tnu vodenu otopinu etanola 90,14-122,73 mg QE/100 g. Fatemeh i sur. (2012) istraživali su utjecaj različitih sorti banana (Cavendish i Dream), faze zrelosti te različitih dijelova ploda (pulpa i kora) na antioksidativne komponente i antioksidativnu aktivnost banana. Za ekstrakciju su koristili maceraciju s 80 %-tnim metanolom kao otapalom. Zabilježili su udio ukupnih flavonoida u ekstraktima kore banana u rasponu od 39,01 do 389,33 mg CE/100 g, pri čemu su najviše vrijednosti flavonoida pronađene u kori nezrelih banana sorte Cavendish.

Ako se usporede navedene vrijednosti s rezultatima dobivenim u ovom radu, vidljiva su određena odstupanja u vrijednostima koja se mogu objasniti izborom otapala, upotrebom različite tehnike ekstrakcije te različitim porijeklom i sortom banane.

4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Tablica 5. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima liofilizirane kore banane dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima određen FRAP i ABTS metodama izražen preko Trolox ekvivalenta (TE)

BROJ UZORKA	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)	OMJER UZORAK/OTAPALO (g/mL)	FRAP (mmol TE/100 g)	ABTS (mmol TE/100 g)
1	40	5	1:40	36,88±3,20	10,52±0,08
2		10		52,66±5,16	11,30±0,51
3		15		41,81±4,05	12,62±0,76
4	60	5		33,40±0,78	11,42±0,08
5		10		44,21±1,04	11,54±0,17
6		15		37,59±1,57	12,48±0,21
7	80	5		32,68±0,52	16,95±0,51
8		10		36,91±1,44	19,25±0,30
9		15		36,60±1,11	20,09±0,13
10	40	5	1:50	25,37±0,82	13,07±0,11
11		10		24,63±1,06	12,48±0,64
12		15		35,31±1,96	13,27±0,69
13	60	5		35,69±0,90	12,25±0,95
14		10		37,62±1,63	13,34±0,16
15		15		35,97±1,96	14,68±0,16
16	80	5		40,07±0,08	21,88±0,37
17		10		27,29±2,69	18,44±0,27
18		15		31,26±0,49	20,50±1,48
19	40	5	1:60	19,24±0,10	14,71±1,34
20		10		19,66±0,29	12,14±0,51
21		15		18,90±0,79	13,54±0,06
22	60	5		25,44±0,59	14,36±0,45
23		10		22,03±1,28	16,57±1,02
24		15		23,76±1,77	18,42±1,47
25	80	5		38,64±0,20	25,38±0,57
26		10		47,26±1,18	25,97±2,04
27		15		47,68±0,79	26,69±1,92

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

Antioksidacijski kapacitet mjeran FRAP metodom određen je u rasponu od $18,90 \pm 0,79$ do $52,66 \pm 5,16$ mmol TE/100 g. Najviša vrijednost određena je u uzorku broj 2, dobivenom pri 40 °C, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku broj 21, dobivenom pri 40 °C, vremenu ekstrakcije 15 min i omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Antioksidacijski kapacitet mjeran ABTS metodom određen je u rasponu od $10,52 \pm 0,08$ do $26,69 \pm 1,92$ mmol TE/100 g. Najviša vrijednost zabilježena je u uzorku broj 27, dobivenom pri 80 °C, vremenu 15 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok je najniža vrijednost određena u uzorku broj 1, dobivenom pri 40 °C, vremenu 5 min i omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL.

Iz rezultata se može vidjeti da vrijednosti dobivene ABTS i FRAP metodama nisu usklađene. Najniže vrijednosti zabilježene su pri istoj temperaturi u obje metode, ali pri različitom vremenu ekstrakcije i različitom omjeru uzorka i otapala. Najviše vrijednosti obje metode zabilježene su pri različitim parametrima (temperatura, vrijeme ekstrakcije, omjer uzorka i otapala). Dobivanje različitih rezultata može biti posljedica toga što se navedene metode temelje na različitim mehanizmima reakcije i imaju različitu osjetljivost na specifične vrste antioksidansa.

Vu i sur. (2019b) proveli su MAE kore banane te su istražili utjecaj različitih parametara, kao što su pH otapala, omjer uzorka i otapala te trajanje ekstrakcije, na antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, mjenog FRAP metodom, određene su u rasponu od 16,87 do 37,50 mmol TE/100 g, što je u skladu s vrijednostima dobivenim u ovom radu. Najviša vrijednost zabilježena je kod uzorka dobivenog pri pH=1 otapala, vremenu ekstrakcije 6 min te omjeru uzorka i otapala 1:50 g/mL, dok je najniža vrijednost zabilježena kod uzorka pri pH=2 otapala, vremenu ekstrakcije 2 min te omjeru uzorka i otapala 1:25 g/mL.

Nešto niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, mjenog ABTS i FRAP metodama, zabilježili su Khamsaw i sur. (2024). Proveli su konvencionalnu ekstrakciju kore banane koristeći diklormetan i metanol kao ekstrakcijska otapala. Antioksidacijski kapacitet mjeran ABTS metodom u metanolnom ekstraktu iznosio je 13,74 mmol TE/100 g, dok je u diklormetanskom ekstraktu iznosio 6,12 mmol TE/100 g. Antioksidacijski kapacitet mjeran FRAP metodom u metanolnom ekstraktu iznosio je 0,20 mmol TE/100 g, a u diklormetanskom ekstraktu 0,09 mmol TE/100 g. Usporedbom vrijednosti dobivenih u ovom radu s onima iz rada Khamsaw i sur. (2024), uočava se da je primjena MAE uz upotrebu DES-a rezultirala višim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta mjenog ABTS i FRAP metodama u odnosu na ekstrakciju diklormetanom i metanolom.

4.4. UTJECAJ PARAMETARA MAE NA UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA, UKUPNIH FLAVONOIDA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LIOFILIZIRANE KORE BANANE

Tablica 6. Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonoida i antioksidacijski kapacitet liofilizirane kore banane određen FRAP i ABTS metodama

Izvor varijacije	Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg CE/100 g)	Ukupni flavonoidi (mg QE/100 g)	FRAP (mmol TE/100 g)	ABTS (mmol TE/100 g)
Temperatura (°C)	p<0,01*	p<0,01*	p=0,06	p<0,01*
40	320,17±7,69 ^b	137,30±3,38 ^a	30,50±2,74 ^a	12,63±0,30 ^a
60	341,01±8,61 ^b	161,75±4,42 ^b	32,86±1,72 ^a	13,90±0,56 ^a
80	252,05±11,29 ^a	137,38±6,13 ^a	37,60±1,58 ^a	21,68±0,83 ^b
Vrijeme ekstrakcije (min)	p=0,16	p=0,04*	p=0,71	p=0,37
5	286,78±12,80 ^a	134,27±6,30 ^a	31,94±1,63 ^a	15,62±1,15 ^a
10	313,02±13,13 ^a	152,42±3,77 ^b	34,70±2,74 ^a	15,67±1,13 ^a
15	313,45±12,32 ^a	149,74±5,18 ^{ab}	34,32±2,03 ^a	16,92±1,12 ^a
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)	p=0,02*	p=0,05*	p<0,01*	p<0,01*
1:40	274,82±12,91 ^a	136,27±5,38 ^a	39,19±1,49 ^b	14,02±0,85 ^a
1:50	313,52±12,68 ^{ab}	145,50±5,52 ^{ab}	32,58±1,32 ^{ab}	15,55±0,86 ^{ab}
1:60	324,90±10,33 ^b	154,66±4,75 ^b	29,18±2,74 ^a	18,64±1,35 ^b

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju pri $p \leq 0,05$.

Temperatura je pokazala statistički značajan utjecaj na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonoida te antioksidacijski kapacitet ekstrakata liofilizirane kore banane određen ABTS metodom. Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina postignuta je pri 60 °C. Ta je vrijednost statistički značajno viša od one postignute pri 80 °C, međutim, nije statistički različita od vrijednosti zabilježene pri 40 °C, što pokazuje da povišenje temperature iznad 60 °C uzrokuje smanjenje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Đurović i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su promatrali utjecaj MAE na profil fenolnih kiselina u ekstraktu žutih sjemenki soje. Rezultati su pokazali kako varijacije temperature (55, 65, 75 i 85 °C) i vremena tijekom MAE su značajno utjecale na prinos fenolnih kiselina. Povećanje temperature mikrovalova od 55 do 85 °C povećao je sadržaj fenolnih kiselina. Sadržaj ferulinske kiseline i *p*-kumarinske kiseline značajno je porastao na višim temperaturama.

Optimalna temperatura za ekstrakciju ovih kiselina bila je 85 °C, što je rezultiralo najvećim prinosima ovih spojeva. Međutim, kod galne i klorogenske kiseline došlo je do blagog pada u prinosu pri najvišoj temperaturi (85 °C).

Vrijednosti udjela ukupnih flavonoida prate isti trend kao i vrijednosti hidroksicimetnih kiselina. Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih flavonoida postignuta je pri 60 °C, a ta je vrijednost statistički značajno viša od one postignute pri 40 i 80 °C. Sličan trend porasta udjela flavonoida s povećanjem temperature primijetili su i Irakli i sur. (2023) u svom istraživanju, gdje su proveli MAE na ostatcima kadulje nakon ekstrakcije eteričnog ulja. Njihovi rezultati pokazali su da se udio ukupnih flavonoida u ekstraktima kadulje povećavao s porastom temperature do 65 °C, dok su više temperature (90 °C) uzrokovale pad prinosa.

Gao i sur. (2020) optimizirali su ekstrakciju fenolnih spojeva iz listova duda (*Morus alba* L.) koristeći MAE u kombinaciji s DES-om. Varirali su ključne parametre ekstrakcije poput omjera uzorka i otapala, temperature (45-75 °C) i vremena kako bi postigli maksimalan prinos fenolnih spojeva. Rezultati su pokazali da je povećanje temperature isprva dovelo do povećanja prinosa fenolnih kiselina i flavonoida, dok je daljnje povećanje iznad 66 °C uzrokovalo smanjenje prinosa. Ovi rezultati prate trend zabilježen u ovom radu, što potvrđuje da povišenje temperature iznad određenog praga može negativno utjecati na prinos ciljanih spojeva.

Iako se vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene FRAP metodom ne razlikuju statistički značajno, postoji trend blagog porasta s povišenjem temperature, što može ukazivati na poboljšanu dostupnost nekih bioaktivnih spojeva. S druge strane, antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom pokazao je statistički značajne razlike, s najvišom vrijednošću određenom u ekstraktu dobivenom pri 80 °C, dok su niže temperature (40 i 60 °C) zabilježile značajno niže vrijednosti. U već spomenutom istraživanju Irakli i sur. (2023) određen je antioksidacijski kapacitet ABTS metodom te su rezultati pokazali kako je temperatura imala značajan utjecaj. Povišenje temperature do 70 °C rezultiralo je većom antioksidacijskom aktivnošću, međutim iznad te temperature došlo je do smanjenja vrijednosti. Ovi rezultati sugeriraju da povišenje temperature poboljšava ekstrakciju bioaktivnih spojeva, uključujući fenole i druge antioksidanse, čime se povećava ukupni antioksidacijski kapacitet.

Rezultati statističke analize pokazali su da vrijeme ekstrakcije nema statistički značajan utjecaj na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina, kao ni na antioksidacijski kapacitet određen FRAP i ABTS metodama. Međutim, vrijeme ima statistički značajan utjecaj na udio ukupnih flavonoida. Najviša vrijednost udjela ukupnih flavonoida zabilježena je pri 10 min ekstrakcije, dok je pri 5 min ekstrakcije zabilježena statistički značajno niža vrijednost. Vrijednost pri 15 min ekstrakcije također je viša nego pri 5 min, ali se statistički ne razlikuje od one pri 10 min ekstrakcije. U već spomenutom radu Gao i sur. (2020) vrijeme ekstrakcije također je imalo utjecaj na prinos

flavonoida, pri čemu su varirali vrijeme ekstrakcije od 8 do 24 min. Rezultati su pokazali da je porastom vremena ekstrakcije do 18 min prinos flavonoida rastao, međutim pri vremenu ekstrakcije iznad 18 min zabilježen je pad prinosa zbog mogućih promjena kemijske strukture bioaktivnih spojeva (Gao i sur., 2020).

Omjer uzorka i otapala imao je statistički značajan utjecaj na sve promatrane zavisne varijable, pri čemu su najviše prosječne vrijednosti udjela ukupnih hidrokscimetnih kiselina, udjela ukupnih flavonoida te antioksidacijskog kapaciteta mjenog ABTS metodom postignute pri omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL, dok su najniže vrijednosti zabilježene pri omjeru 1:40 g/mL. Vrijednost pri omjeru 1:50 g/mL predstavlja međuvrijednost, koja nije statistički značajno različita od vrijednosti pri omjeru 1:40 i 1:60 g/mL. Rezultati pokazuju da povećanje omjera uzorka i otapala rezultira većim udjelom hidrokscimetnih kiselina, flavonoida i antioksidacijskim kapacitetom određenim ABTS metodom, s najvišim vrijednostima zabilježenim pri omjeru 1:60 g/mL. Ovi rezultati su u skladu s već spomenutim istraživanjem Irakli i sur. (2023), koji su utvrdili da povećanje omjera uzorka i otapala povećava prinos ukupnih flavonoida i antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom. U njihovom istraživanju, omjer 1:30 g/mL pokazao se optimalnim za MAE, omogućujući maksimalan prinos flavonoida i antioksidacijski kapacitet, dok su niži omjeri (1:10 i 1:20 g/mL) rezultirali slabijom ekstrakcijom bioaktivnih spojeva i nižim prinosima.

Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju važnost pravilnog omjera uzorka i otapala, koji ne samo da osigurava ravnomjerno i učinkovito zagrijavanje cijelog sustava, već istovremeno povećava koncentracijski gradijent, čime se potiče prijenos mase fenola u ekstrakcijsko otapalo, što rezultira većim prinosom spojeva (Dahmoune i sur., 2014). Osim toga, optimalan omjer otapala i čvrste tvari sprječava zasićenje otapala otopljenim tvarima te smanjuje rizik od pregrijavanja sustava i toplinskog oštećenja važnih spojeva (Vargas-Serna i sur., 2022).

S druge strane, antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom pokazuje suprotan trend, s najvišim vrijednostima određenim pri omjeru 1:40, što je statistički značajno više u usporedbi s vrijednostima određenim pri omjeru 1:60. Lin i sur. (2020) su proveli MAE na lišću jagode te su zabilježili kako povećanje omjera do određene točke, odnosno do omjera 1:60 g/mL, je rezultiralo povećanjem antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom. Međutim, daljnje povećanje omjera iznad 1:60 g/mL dovelo je do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta, što su objasnili time da prevelik volumen otapala može razrijediti koncentraciju fenolnih spojeva u otopini, smanjujući učinkovitost ekstrakcije i posljedično smanjujući antioksidacijski kapacitet.

5. ZAKLJUČCI

1. Kora banane sadrži značajan udio hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te pokazuje značajni antioksidacijski kapacitet, što ukazuje na njen potencijal kao izvora bioaktivnih spojeva za daljnju valorizaciju u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.
2. Prosječna vrijednost ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz kore banane pomoću MAE uz mješavinu kolin klorida i glicerola (1:3) s 30 % vode (w/w) kao ekstrakcijskog otapala iznosila je 378,96 mg CE/100 g, a prosječna vrijednost ekstrahiranih ukupnih flavonoida iznosila je 189,69 mg QE/100 g. Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom bila je 52,66 mmol TE/100 g, dok je za ABTS metodu iznosila 26,69 mmol TE/100 g.
3. Optimalni MAE uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz kore banane, koji su rezultirali najvišim prinosom, uključuju: temperaturu 60 °C, vrijeme ekstrakcije 10 min te omjer uzorka i otapala 1:50 g/mL.
4. Ispitivani parametri ekstrakcije, odnosno temperatura te omjer uzorka i otapala, imali su statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, kao i na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivenih primjenom FRAP i ABTS metoda, dok je vrijeme ekstrakcije imalo statistički značajan utjecaj isključivo na udio ukupnih flavonoida.
5. Ovo istraživanje pokazalo je da kombinacija MAE i DES-a predstavlja učinkovit i ekološki prihvatljiv pristup za valorizaciju kore banane, omogućujući izolaciju visokih prinosa bioaktivnih spojeva, čime se doprinosi održivosti i potencijalnom smanjenju biootpada.

6. LITERATURA

- Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc*, **126**, 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
- Alam MDA, Muhammad G, Khan MN, Mofijur M, Lv Y, Xiong W, Xu J (2021) Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass. *J Clean Prod*, **309**, 127445. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127445>
- 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>
- Augustus Binu (2015) Cavendish banana https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cavendish_Banana_DS.jpg Pristupljeno 10. rujna 2024.
- Avram I, Gatea F, Vamanu E (2022) Functional compounds from banana peel used to decrease oxidative stress effects. *Processes*, **10(2)**, 248. <https://doi.org/10.3390/pr10020248>
- Bashmil YM, Ali A, BK A, Dunshea FR, Suleria HAR (2021) Screening and characterization of phenolic compounds from australian grown bananas and their antioxidant capacity. *Antioxidants*, **10(10)**, 1521. <https://doi.org/10.3390/antiox10101521>
- Behiry SI, Okla MK, Alamri SA, El-Hefny M, Salem MZ, Alaraidh IA, Salem AZ (2019) Antifungal and antibacterial activities of *Musa paradisiaca* L. peel extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid contents. *Processes*, **7(4)**, 215. <https://doi.org/10.3390/pr7040215>
- Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem*, **29(2)**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*, **239(1)**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- Camel V (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal Chem*, **19**, 229-248. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00185-5)
- Camel V (2001) Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*, **126(7)**, 1182–1193. <https://doi.org/10.1039/b008243k>
- Carriazo D, Serrano MC, Gutiérrez MC, Ferrer ML, del Monte F (2012) Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem Soc Rev*, **41**, 4996–5014. <https://doi.org/10.1039/c2cs15353j>
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, **10(3)**, 178-182. <http://dx.doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biot*, **90**, 1631-1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>
- Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K (2015) Optimization of microwave assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*, **166**, 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>
- Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius*. *Anal Chem*, **85**, 6272-6278. <https://doi.org/10.1021/ac400432p>
- Destandau E, Michel T (2022) Microwave-assisted extraction. U: Prado J, Rostagno M (ured.), Natural product extraction: Principles and applications, 2. izd., The Royal Society of Chemistry, London, str.144-201. <https://doi.org/10.1039/9781839165894-00144>
- Durand E, Lecomte J, Villeneuve P (2013) Deep eutectic solvents: synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *J Lipid Sci Technol*. **115**, 379-385. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200416>
- Đurović S, Nikolić B, Luković N, Jovanović J, Stefanović A, Šekuljica N, Mijin D, Knežević-Jugović Z (2018) The impact of high-power ultrasound and microwave on the

phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds, *Ind Crop Prod*, **122**, 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.078>

- Encyclopedia Britannica (2024) Entertainment & pop culture - food - pea, <https://www.britannica.com/plant/banana-plant> Pristupljeno 3. rujna 2024.
- Eskilsson CS, Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chromatogr*, **902(1)**, 227–250. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00921-3)
- Faller ALK, Fialho E (2010) Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *J Food Compos Anal*, **23(6)**, 561–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.01.003>
- FAO (2022) Crop statistics, FAO-Food and agriculture organization of the united nations <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> Pristupljeno 3. rujna 2024.
- Fatemeh SR, Saifullah R, Abbas FMA., Azhar ME (2012) Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of banana pulp and peel flours: Influence of variety and stage of ripeness. *Int Food Res J*, **19(3)**, 1041–1046.
- Ganzler K, Szinai I, Salgo A (1990) Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J chromatogr*, **520**, 257–262. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(90\)85109-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(90)85109-9)
- Gao MZ, Cui Q, Wang LT, Meng Y, Yu L, Li YY, Fu YJ (2020) A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchem J*, **154**, 104598. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104598>.
- González-Montelongo R, Lobo MG, González M (2010) Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem*, **119**, 1030-1039. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.08.012>
- 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>
- Hernández-Carranza P, Ávila-Sosa R, Guerrero-Beltrán JA, Navarro-Cruz AR, Corona-Jiménez E, Ochoa-Velasco CE (2016) Optimization of bioactive compounds

from by-product, *J Food Process Preserv*, **40**, 103-115.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12588>

- Hikal WM, Said-Al Ahl, HAH, Bratovic A, Tkachenko KG, Sharifi-Rad J, Kačániová M, Elhourri M, Atanassova M (2022) Banana peels: a waste treasure for human being, *Evid Based Complement Alternat Med*, **13**, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2022/7616452>
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric* **83(12)**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>
- Irakli M, Bouloumpasi E, Christaki S, Skendi A, Chatzopoulou P (2023) Modeling and optimization of phenolic compounds from sage (*Salvia fruticosa* L.) post-distillation residues: Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Antioxidants*, **12**, 549. <https://doi.org/10.3390/antiox12030549>.
- Itelima J, Onwuliri F, Onwuliri E, Onyimba I, Oforji S (2013) Bio-ethanol production from banana, plantain and pineapple peels by simultaneous saccharification and fermentation process, *Int J Environ Sci Dev*, **4**, 213-216. <http://dx.doi.org/10.7763/IJESD.2013.V4.337>
- Jiang ZM, Wang LJ, Gao Z, Zhuang B, Yin Q, Liu EH (2019) Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents, *Microchem J*, **145**, 345–353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.057>
- Kanazawa K, Sakakibara H (2000) High content of dopamine, a strong antioxidant in cavendish banana. *J Agri Food Chem*, **48**, 844-848. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9909860>
- Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal*, **13**, 105-113. <https://doi.org/10.1002/pca.631>
- Khamsaw P, Sommano SR, Wongkaew M, Willats WGT, Bakshani CR, Sirilun S, Sunanta P (2024) Banana Peel (*Musa* ABB cv. Nam Wa Mali-Ong) as a source of value-adding components and the functional properties of its bioactive ingredients. *Plants*, **13(5)**, 593. <https://doi.org/10.3390/plants13050593>

- Lin D, Ma Q, Zhang Y, Peng Z (2020) Phenolic compounds with antioxidant activity from strawberry leaves: a study on microwave-assisted extraction optimization. *Prep Biochem Biotechnol*, **50(9)**, 874-882. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1762213>
- Lloyd PJ, van Wyk J (2012) Introduction to extraction in food processing. U: Lebovka F, Vorobiev N, Chemat E (ured.), Enhancing extraction processes in the food industry, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, str.1-24. <http://dx.doi.org/10.1201/b11241-2>
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79(5)**, 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn Rev*, **1**, 7- 18.
- Mohapatra D, Sabyasachi M, Sutar N (2010) Banana and its biproduct utilization. *J Sci Ind Res*, **69**, 232-329. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53511531>
- Mohd Zaini H, 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>
- Morais DR, Rotta EM, Sargi SC, Schmidt EM, Bonafe EG, Eberlin MN, Visentainer JV (2015) Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Res Int*, **77**, 392–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036>
- Ongphimai N, Lilitchan S, Aryusuk K, Bumrungpert A, Krisnangkura K (2013) Phenolic acids content and antioxidant capacity of fruit extracts from Thailand. *Chiang Mai J Sci*, **40(4)**, 636-642.
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *Sustain Chem Eng*, **2**, 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci*, **5**, 1-15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

- Passo Tsamo CV, Herent MF, Tomekpe K, Happi Emaga T, Quetin-Leclercq J, Rogez H, Andre C (2015) Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). *Food Chem*, **167**, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.095>
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr*, **133(9)**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- 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>
- Pereira MAF, Monteiro CRM, Pereira GN, Júnior SEB, Zanella E, Ávila PF, Poletto P (2020) Deconstruction of banana peel for carbohydrate fractionation. *Bioproc Biosyst Eng*, **44(2)**, 297-306. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02442-1>
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Putra NR, Aziz AHA, Faizal ANM, Che Yunus MA (2022) Methods and potential in valorization of banana peels waste by various extraction processes: In review. *Sustainability*. **14(17)**, 10571. <https://doi.org/10.3390/su141710571>
- Putri HN, Nursanto EB, Floresyona D, Ayoub M, Yusouf MHM (2023) Extraction of flavonoid content from banana peel (*Musa paradisiaca* L.) by ultrasound-assisted extraction method and its SPF value. *J Emerg Supply Chain Clean Energy Process Eng*, **2(2)**, 179–186. <http://dx.doi.org/10.57102/jescee.v2i2.73>
- Rogers RD, Seddon KR (2003) Ionic liquids - solvents of the future? *Science*, **302**, 792– 793. <https://doi.org/10.1126/science.1090313>
- Romera-Castillo C, Jaffé R (2015) Free radical scavenging (antioxidant activity) of natural dissolved organic matter. *Mar Chem*, **177**, 668-676. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.10.008>
- Routray W, Orsat V (2011) Microwave-assisted extraction of flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Tech*. **5(2)**, 409–424. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>

- Russell WR, Labat A, Scobbie L, Duncan GJ, Duthie GG (2009) Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chem*, **115(1)**, 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.086>
- Santhoskumar AU, Vaishnavi R, Karunakaran T (2019) Studies on mechanical properties and biodegradation of edible food wrapper from banana peel. *Asian J. Adv. Basic Sci*, **7(2)**, 1-4.
- Sekharan TR, Chandira RM, Tamilvanan S, Rajesh SC, Venkateswarlu BS (2022) Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Biointerface Res Appl Chem*, **12**, 847–860. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.847860>
- Serna-Jimenez J, Fernando LL, Caballero A, Martín M, Chica AF, Siles JA (2021) Valorisation of banana peel waste as a precursor material for different renewable energy systems. *Biomass Bioenergy*. **155**, 106279. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106279>
- Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, **18**, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shams KA, Abdel-Azim NS, Saleh IA, Hegazy MEF, El-Missiry MM, Hammouda FM (2015) Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J Chem Pharm Res*, **7(5)**, 1050-1074.
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N (2016) Bioactive compounds in banana and their associated health benefits - A review. *Food Chem*, **206**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.033>
- Sirajudin ZNM, Ahmed QU, Chowdhury AJK, Kamarudin EZ, Khan AV, Uddin ABMH, Musa N (2014) Antimicrobial activity of banana (*Musa paradisiaca* L.) peels against food borne pathogenic microbes. *J Pure Appl Microbio*, **8**, 3627–3639. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82684424>
- Sulaiman SF, Yusoff NAM, Eldeen IM, Seow EM, Sajak AAB, Supriatno Ooi KL (2011) Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *J Food Compos Anal*, **24(1)**, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.005>

- Sundaram S, Anjum S, Dwivedi P, Rai G (2011) Antioxidant activity and protective effect of banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening. *App Biochem Biotech*, **164(7)**, 1192–1206. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9205-3>
- Tallapally M, Sadiq AS, Mehtab V, Chilakala S, Vemula M, Chenna S, Upadhyayula V (2020) GC-MS based targeted metabolomics approach for studying the variations of phenolic metabolites in artificially ripened banana fruits. *LWT*, **130**, 109622. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109622>
- Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, Garcia-Viguera C (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *Int J Mol Sci*, **15**, 15638-15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Udosen EO, Enang MI (2000) Chemical composition and soaping characteristics of peels from plantain (*Musa paradisiaca*) and banana (*Musa sapientum*). *Global J Pure Appl Sci*, **6**, 79-81. <https://doi.org/10.4314/gjpas.v6i1.16081>
- Umesh M, Preethi K (2014) Fermentative utilization of fruit peel waste for lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Ind J Appl Res*, **4 (9)**, 449-451. [https://www.worldwidejournals.com/indian-journal-of-applied-research-\(IJAR\)/fileview/September_2014_1492846102_133.pdf](https://www.worldwidejournals.com/indian-journal-of-applied-research-(IJAR)/fileview/September_2014_1492846102_133.pdf)
- Usman M, Nakagawa M, Cheng S (2023) Emerging trends in green extraction techniques for bioactive natural products. *Processes*, **11(12)**, 3444. <https://doi.org/10.3390/pr11123444>
- Uzel RA (2018) Microwave-assisted green extraction technology for sustainable food processing. U: Kok Yeow Y (ured.) Emerging microwave technologies in industrial, agricultural, medical and food processing, IntechOpen, Rijeka, str. 160-178. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76140>
- Vargas-Serna CL, Ochoa-Martínez CI, Vélez-Pasos C (2022) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from pineapple peel using deep eutectic solvents. *Horticulturae*, **8(9)**, 791. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090791>

- Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Chemat F, Cravotto G (ured.), Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, Springer Science, New York, str. 15-52.
- Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review, *J Funct Foods*, **40**, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>
- Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2019a) Changes of phytochemicals and antioxidant capacity of banana peel during the ripening process; with and without ethylene treatment. *Sci Hortic*, **253**, 255-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.043>
- Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2019b) Maximising recovery of phenolic compounds and antioxidant properties from banana peel using microwave assisted extraction and water. *J Food Sci Technol*, **56**, 1360–1370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03610-2>
- Wang G, Cui Q, Yin LJ, Zheng X, Gao MZ, Meng Y, Wang W (2019) Efficient extraction of flavonoids from Flos Sophorae Immaturus by tailored and sustainable deep eutectic solvent as green extraction media, *J Pharmaceut Biomed*, **170**, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.032>
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Techn*, **17**, 300-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Zhang H, Tang B, Row K (2014) Extraction of catechin compounds from green tea with a new green solvent, *Chem Res Chin*, **30**, 37–41. <https://doi.org/10.1007/s40242-014-3339-0>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marija Zorić 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