

# Utjecaj uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na izolaciju fenolnih spojeva iz komine borovnice

---

**Brkljačić, Marta**

**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:159:365780>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Marta Brkljačić

**UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE  
POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA NA  
IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA IZ  
KOMINE BOROVNICE**

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

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta “Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća” (HRZZ-IP-2022-10-5499) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović Uzelac.



*Ovim putem izražavam duboku zahvalnost mentorici, prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i nesebičnom dijeljenju znanja tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem i dr. sc. Eni Cegledi na pruženoj pomoći, stručnoj podršci i dodatnim uputama. Njihova posvećenost i strpljenje bili su mi od velike pomoći u svim fazama izrade rada.*

*Posebno se zahvaljujem prijateljima, a ponajviše svojim roditeljima i dečku, koji su mi pružili neopisivu podršku i ljubav tijekom cijelog procesa. Njihova prisutnost, motivacija i vjera u mene činili su ovo akademsko putovanje ne samo lakšim, već i neizmjereno značajnijim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNE MIKROVALOVIMA NA IZOLACIJU FENOLNIH  
SPOJEVA IZ KOMINE BOROVNICE

Marta Brkljačić, univ. bacc. ing. techn. aliment  
0058213777

**Sažetak:** Preradom plodova borovnice u sokove zaostaje komina kao nusproizvod bogat bioaktivnim spojevima, osobito antocijanima i fenolnim spojevima, poznatim po antioksidacijskim svojstvima i potencijalnim zdravstvenim koristima. Stoga je cilj rada bio ispitati utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) na udio ukupnih fenola, antocijana i antioksidacijski kapacitet u komini borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.). Varirani su omjer uzorak:otapalo (1:20, 1:40 i 1:60 g/mL), temperatura (40, 60 i 80 °C) i vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min). Fenoli su određeni u rasponu 28,93-75,86 mg/g s.tv., antocijani 3,63-6,25 mg/g s.tv., antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom varirao je između 105,62-538,43 µmol/g s.tv., a ABTS metodom između 203,72-851,39 µmol/g s.tv. Temperatura i omjer uzorak:otapalo značajno su utjecali na sve parametre, dok vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo. Optimalni uvjeti za najveći prinos fenola i antocijana te najveći antioksidacijski kapacitet su omjer uzorak:otapalo 1:40, temperatura 80 °C i vrijeme ekstrakcije 5 min. Rezultati pokazuju da MAE ima velik potencijal za valorizaciju nusproizvoda bobičastog voća, što je potvrđeno na primjeru borovnice.

**Ključne riječi:** komina borovnice, ukupni fenoli, antocijani, antioksidacijski kapacitet, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

**Rad sadrži:** 43 stranice, 14 slika, 2 tablice, 97 literaturnih navoda, 0 priloga  
**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Ena Cegledi

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 20. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

INFLUENCE OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION CONDITIONS ON THE ISOLATION OF  
PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLUEBERRY POMACE

Marta Brkljačić, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058213777

**Abstract:** After the processing of blueberry fruits into juices, pomace remains as a by-product, which is a rich source of bioactive compounds, particularly anthocyanins and phenolic compounds, known for their antioxidant properties and potential health benefits. Therefore, the aim of this study was to examine the influence of microwave-assisted extraction (MAE) parameters on the content of total phenols, anthocyanins and antioxidant capacity in blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace. The following parameters were varied: sample-to-solvent ratio (1:20, 1:40 and 1:60 g/mL), temperature (40, 60 and 80 °C) and extraction time (5 and 10 min). Phenolic content ranged from 28,93-75,86 mg/g d.w., anthocyanins from 3,63-6,25 mg/g d.w., antioxidant capacity determined by the FRAP method varied between 105,62-538,43 µmol/g d.w., and by the ABTS method between 203,72-851,39 µmol/g d.w.. Temperature and sample-to-solvent ratio significantly affected all parameters, while extraction time had no significant effect. The optimal conditions for achieving the highest phenolic and anthocyanin content and the greatest antioxidant capacity were at a sample-to-solvent ratio of 1:40, a temperature of 80 °C and an extraction time of 5 min. The results demonstrate that MAE has great potential for valorizing berry fruit by-products, as shown in the example of blueberries.

**Keywords:** blueberry pomace, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacity, microwave-assisted extraction (MAE)

**Thesis contains:** 43 pages, 14 figures, 2 tables, 97 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Verica Dragović- Uzelac, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Ena Cegledi, PhD

### Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (president)
2. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (mentor)
3. Tomislava Vukušić-Pavičić, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra Balbino, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 20<sup>th</sup>, 2024.



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. BOROVNICA</b> .....	<b>2</b>
2.1.1.    Kemijski sastav borovnice . . . . .	3
2.1.1.1.    Fenolni spojevi . . . . .	4
2.1.1.2.    Antocijani . . . . .	5
2.1.1.3.    Biološko djelovanje borovnice . . . . .	7
2.1.2.    Komina borovnice . . . . .	8
<b>2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA</b> .....	<b>10</b>
2.1.3.    Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) . . . . .	10
2.1.3.1.    Utjecaj parametara MAE na izolaciju bioaktivnih molekula . . . . .	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>13</b>
3.1.1.    Uzorak komine borovnice . . . . .	13
3.1.2.    Kemikalije i standardi . . . . .	14
3.1.3.    Laboratorijska oprema i pribor . . . . .	16
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>17</b>
3.2.1.    Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom MAE . . .	17
3.2.2.    Određivanje ukupnih fenola . . . . .	18
3.2.3.    Određivanje antocijana . . . . .	20
3.2.4.    Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom . . . . .	21
3.2.5.    Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom . . . . .	22
3.2.6.    Obrada podataka . . . . .	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>25</b>
4.2.1.    Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih fenola . . . . .	25
4.2.2.    Utjecaj parametara MAE na udio antocijana . . . . .	29
4.2.4.    Utjecaj parametara MAE na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom . . . . .	33
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>

## 1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je višegodišnji grm iz porodice Ericaceae, rasprostranjen u hladnijim klimama Europe i Azije. Bogata je makro- i mikronutrijentima te bioaktivnim spojevima poput fenolnih kiselina, antocijana i flavonoida i drugih skupina fenolnih spojeva, kojima se pripisuju protuupalna, antioksidativna i druga djelovanja. Posebnu pažnju znanstvenika privukla je komina borovnice, nusproizvod koji nastaje tijekom prerade u sokove, a čini oko 20 % ukupne mase svježeg ploda. Komina, koja se sastoji od kožice, sjemenki i ostataka pulpe, izuzetno je vrijedna sirovina za prehrambenu industriju jer sadrži koncentrirane bioaktivne spojeve, uključujući fenole (Šarić i sur., 2016; Bamba i sur., 2018). Osim što borovnicama daju prepoznatljivu plavo-ljubičastu boju, fenoli, poput antocijana, posjeduju snažna antioksidacijska svojstva koja pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala i smanjuju oksidativni stres. Zbog navedenih karakteristika, antocijani su povezani s prevencijom dijabetesa, raka, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti (Rossi i sur., 2022; Wang, 2024).

Nedavne inicijative za smanjenje otpada u prehrambenoj industriji, motivirane rastućom zabrinutošću za okoliš i gubitak hrane, usmjerene su na ostvarenje ciljeva "Hrana 2030" i održivog razvoja. FAO koncept "održive prehrane" naglašava važnost sustava koji omogućuju zdravu prehranu uz smanjenje negativnog utjecaja na okoliš. Ključni izazov predstavlja iskorištavanje otpada i nusproizvoda od prerađenih voćnih i povrtnih sirovina, kako bi se proizvele nove vrste sirovina i dodataka za prehrambenu industriju, pa čak i gotovi proizvodi.

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog materijala ključni je korak u nizu faza koje vode prema proizvodnji poluproizvoda poput ekstrakata ili prahova koji se primjenjuju u proizvodnji funkcionalne hrane i dodataka prehrani. Pokazalo se da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-Assisted Extraction, MAE*) napredna i učinkovita tehnika izolacije fenola i antocijana iz različitih biljnih matriksa. Ova metoda olakšava otpuštanje bioaktivnih spojeva iz biljnih stanica brzim i selektivnim zagrijavanjem uzorka i otapala koristeći energiju mikrovalova. MAE omogućuje kraće vrijeme obrade, pruža visoku selektivnost prema ciljnim spojevima te smanjuje potrošnju energije i otapala (Vinatoru i sur., 2017). Unatoč prednostima, učinkovitost MAE ovisi o optimizaciji varijabli uključujući vrstu i polarnost otapala, snagu mikrovalova, omjer uzorka i otapala, temperaturu i vrijeme ekstrakcije. Neadekvatan omjer uzorka i otapala može smanjiti učinkovitost ekstrakcije, dok previsoka temperatura može razgraditi termolabilne spojeve poput antocijana (Zhao, 2018).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio optimirati uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom MAE pri čemu su varirani omjer uzorak:otapalo (1:20, 1:40 i 1:60 g/mL), temperatura (40, 60 i 80 °C) i vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) kako bi se postigli najviši prinosi ukupnih fenola i antocijana, kao i antioksidacijski kapacitet.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BOROVNICA

Rod *Vaccinium L.*, porodica vrjesovki (*Ericaceae*), vrlo je star i procjene broja vrsta kreću se od 150 do 450. Sadrži široku raznolikost kulturno i gospodarski važnih vrsta bobičastog voća, među koje ubrajamo borovnicu (*V. angustifolium*), sjevernoameričku borovnicu (*V. corymbosum*), domaću europsku borovnicu (*V. myrtillus*), močvarnu borovnicu (*V. uliginosum*) i brusnicu (*V. vitis-idaea*). Sve komercijalne borovnice potječu iz Sjeverne Amerike, a njihov uzgoj počeo je u SAD-u 1893. godine (Miljković, 2006). Često se naziva i borovnicom visokog grma ('blueberry') i u Europi je prvi put predstavljena 1930-tih godina, dok se europska borovnica još naziva i borovnicom niskog grma ('bilberry'). Možemo ih pronaći u cijeloj mediteranskoj regiji, Kavkazu, Iranu na jugu i granicama Azije i Europe do Sjevernog pola. U Hrvatskoj je najviše zastupljena borovnica roda *Vaccinium myrtillus L.* koja raste na tlu bjelogorične i crnogorične šume, u nizinama i ravninama gustih šuma, ali i na višim nadmorskim visinama planinskih područja do 2000 m. Za razliku od američke, europska borovnica je sitnija, tamno crvenog ili ljubičastog mesnatog dijela, intenzivnijeg je i slađeg okusa, sadrži manje vode, ali više antocijana i najčešće se prodaje u zamrznutom obliku (Mratinić, 2015).

Plod borovnice je zaobljen, stisnut, plavo-ljubičaste boje. Egzokarp i mezokarp čine perikarp ploda borovnice. Mezokarp razvija meso ploda koje je ispunjeno sitnim sjemenkama, a egzokarp oblikuje tanku kožicu borovnice. Vrijeme dozrijevanja borovnice, koje obično traje od kraja lipnja do početka rujna, varira ovisno o sorti i području uzgoja, pa se bobice u komercijalne svrhe beru jednom tjedno u trajanju od minimalno tri do pet tjedana. Boja potječe od prirodnih pigmenata antocijana koji su nosioci različitih nijansi boje plodova borovnice, a ovisno o sorti antocijani mogu biti prisutni samo u kožici kao kod američke borovnice (*V. corymbosum*) ili perikarpu kao što je to kod europske borovnice (*V. myrtillus*). Plod razvija tanki voštani sloj koji sprječava gubitak vlage, utjecaj povišene temperature na sastojke u unutarnjim dijelovima ploda te sprječava potencijalni utjecaj mikroorganizama. Sazrijevanje plodova na grmu odvija se postupno, pri čemu veličina plodova opada s kasnijim berbama. Nakon što poprime plavu boju, plodovi dosežu približno 70 % svoje konačne mase i postaju mekše teksture (Ebert, 2008).

### 2.1.1. Kemijski sastav borovnice

Borovnice su među najtraženijim i najpopularnijim voćem zbog svojih izraženih senzorskih svojstava, visoke nutritivne vrijednosti te značajnog udjela bioaktivnih spojeva. Kemijski sastav samoniklih (šumskih) i kultiviranih borovnica pokazuje određene razlike. Stresni uvjeti u kojima rastu samonikle borovnice potiču sintezu fenolnih spojeva složene kemijske strukture, pri čemu ključnu ulogu imaju abiotički čimbenici (npr. temperatura, UV zračenje i dostupnost vode) te biotički čimbenici (interakcije s mikroorganizmima i biljnim patogenima) (Kellog i sur., 2010).

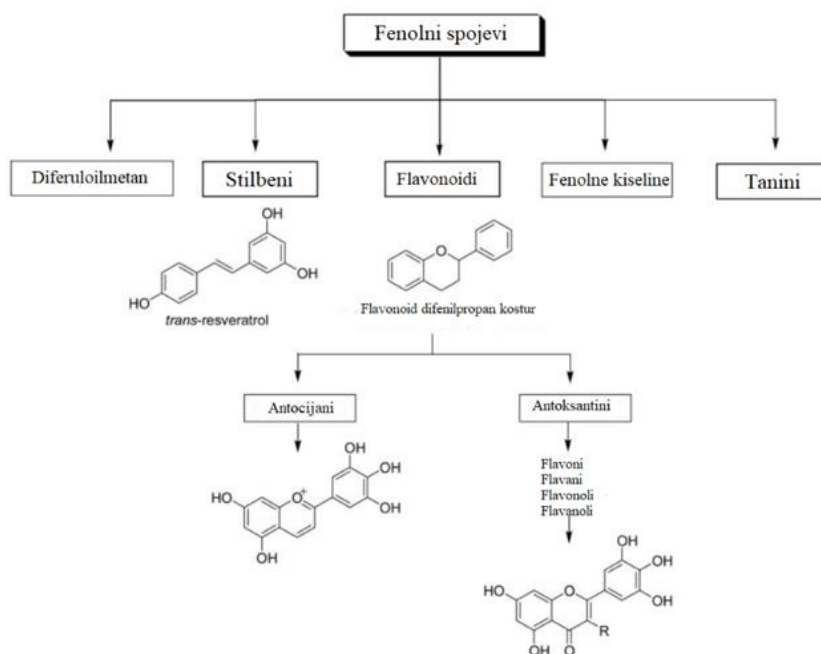
Na udio nutritivno vrijednih sastojaka i bioaktivnih spojeva u borovnici osim okolišnih čimbenika utječu sorta, zrelost ploda te vrijeme berbe. Zorenc i sur. (2016) istraživali su promjene u kvaliteti bobica borovnice tijekom različitih faza berbe. Ustanovili su da se s odmakom vremena berbe, uslijed visokih temperatura i povećane solarne radijacije, težina plodova smanjuje. Istovremeno, sadržaj šećera u plodovima raste, dok se sadržaj organskih kiselina smanjuje, što dovodi do slađeg okusa plodova pri kasnijim berbama u usporedbi s ranijim. Također, uspoređivali su i dva područja uzgoja u okolici Ljubljane i zaključili da lokacija uzgoja značajno utječe na sadržaj primarnih metabolita. Sastav šećera, organskih kiselina i fenolnih spojeva u borovnicama varira tijekom uzastopnih berbi i među sortama.

Nutritivna vrijednost ploda borovnice uključuje nizak udio kalorija, visok udio vlakana, pektina, minerala, vitamina i nezasićenih masnih kiselina (Madhavan i sur., 2023; Herrera-Balandrano i sur., 2021). Prema USDA (2022) plod borovnice sadrži 84,2 g vode i 14,6 g ugljikohidrata. Energetska vrijednost 100 g borovnice iznosi 57 kcal. Ukupni šećeri iznose 9,36 g, a najzastupljeniji šećeri u borovnici su monosaharidi poput fruktoze (4,94 g) i glukoze (4,42 g). Nadalje, borovnice sadrže 19 različitih vrsta aminokiselina, 400-700 mg proteina i 500-600 mg masti na 100 g (Praveen i sur., 2019). Bogate su i mononezasićenim i polinezasićenim masnim kiselinama, među kojima se ističu oleinska (18:1), linolna (18:2) i linolenska (18:3) (Zoratt i sur., 2016).

Razine vitamina i minerala u borovnicama pridonose nutritivnoj vrijednosti plodova. Kuang i sur. (2022) određivali su mineralne tvari u 21 sorti borovnice, te su dobili sljedeće vrijednosti: kalij (565-792 mg/kg) > fosfor (73,8-102 mg/kg) > kalcij (41,6-94,8 mg/kg) > magnezij (35,8-56,3 mg/kg) > mangan (3,43-10,4 mg/kg) = natrij (1,15-17 mg/kg) > željezo (2,06-10 mg/kg) > cink (0,76-2,32 mg/kg) > bakar (0,07-0,46 mg/kg) > bor (0,002-0,37 mg/kg). Borovnica je bogat izvor vitamina C (Kuntz i sur., 2017), vitamina A i vitamina E (Puate i sur., 2011). U usporedbi s jabukama ili grožđem, borovnica ima nekoliko puta veću razinu vitamina, pri čemu se sadržaj vitamina borovnice procjenjuje na 53 mg vitamina C, 2,43-3 mg vitamina A i 2,7-9,5 µg vitamina E/100 g (Duan i sur., 2022). Također, prema istraživanju Feng i suradnika (2019), borovnica je bogat izvor dijetalnih vlakana i pektina u ukupnoj količini od 159,2-509,8 g/kg odnosno 4,1 g/kg zbog čega pozitivno djeluju na probavu i stvaraju osjećaj sitosti.

### 2.1.1.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su velika skupina sekundarnih metabolita prisutnih u biljkama, poznati po svojim antioksidativnim svojstvima i potencijalnim zdravstvenim djelovanjima. Zahvaljujući svojoj strukturi, koja sadrži najmanje jednu hidroksilnu (-OH) skupinu vezanu na aromatski prsten, fenoli mogu neutralizirati slobodne radikale i štiti stanice od oksidativnog stresa. Njihova struktura, temeljena na aromatskom prstenu, može biti različito supstituirana, pa se prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele na flavonoide i neflavonoide (fenolne kiseline i srodne spojeve). Klasifikacija ovih spojeva ovisi o osnovnom kosturu, odnosno broju atoma ugljika u njihovoj strukturi (slika 1). Fenolni spojevi, prisutni u raznim koncentracijama u voću, povrću, čajevima i začinima, uključuju podskupine poput flavonoida, fenolnih kiselina, stilbena, tanina i diferuloilmetana (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).



**Slika 1.** Podjela fenolnih spojeva (prema Han, Shen i Lou, 2007)

Fenolni spojevi biljke štite od štetnih utjecaja iz okoline, istovremeno utječu na njihov rast i razvoj, a tijekom vegetacije sintetiziraju se različite strukture fenolnih spojeva. Kao antioksidansi, štite biljke od oksidativnog stresa izazvanog zagađivačima, patogenima i UV zračenjem. Spojevi poput tanina koji su nosioci trpkog okusa štite biljke od potencijalnih štetnih djelovanja mikroorganizama te u obrani od biljojeda (Cheynier, 2012; Dixon i Paiva, 1995). Osim obrambene funkcije, fenoli su važni u fiziološkim procesima poput oprašivanja i regulacije rasta. Njihova prisutnost u cvjetovima i plodovima doprinosi bojama i mirisima koji privlače oprašivače, a antocijani su odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju biljaka. Fenoli također utječu na okus i kvalitetu voća poput borovnica, cijenjenih zbog visokog sadržaja antocijana. Zbog mogućih zdravstvenih koristi, uključujući smanjenje rizika od srčanih bolesti

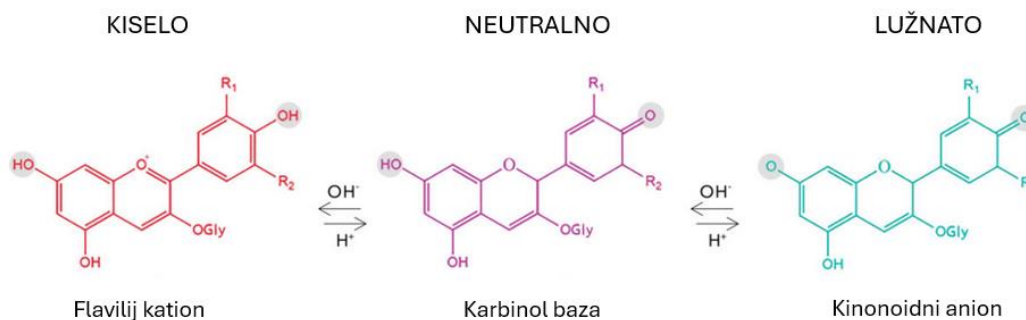
i određenih vrsta raka, fenoli su predmet istraživanja u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Shahidi i Ambigaipalan, 2015; Manach i sur., 2004).

Uvjeti rasta, poput hranjivosti tla, dostupnosti vode, temperature i sunčeve svjetlosti, utječu na fenolne spojeve u biljkama, što je potvrđeno istraživanjima na borovnicama i drugom bobičastom voću (Zoratti i sur., 2015; Uleberg i sur., 2012; Howard i sur., 2003). Razlike među sortama pripisuju se genetskom podrijetlu i uzgojnim uvjetima. Zoranec i sur. (2016) dokazali su da se tijekom višetjednog perioda berbe razina ukupnih šećera povećava, a ukupne organske kiseline smanjuju, što utječe na harmoničan okus plodova. Borovnice ubrane u kasnijima fazama berbe sadrže više antocijana, dok se sadržaj ukupnih fenola smanji što se može pripisati nižim koncentracijama ukupnih derivata hidroksicimetnih kiselina i flavonol glikozida. Uvjeti uzgoja utječu na sadržaj i količinu fenola, a to se posljedično odražava i na njihov udio u komini.

Utvrđeno je da borovnice sadrže više od 11 različitih fenolnih kiselina, uključujući *p*-kumarinsku, ferulinsku, galnu, kafeinsku, cimetnu i klorogensku kiselinu, u ukupnoj koncentraciji od najmanje 85 mg/100 g svježih plodova (Herrera-Balandrano i sur., 2021). Prema istraživanjima, komina borovnice sadrži između 20 i 30 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g suhe tvari ukupnih fenola (Su i Silva, 2006; Määttä-Riihinen i sur., 2004). Komina sadrži koncentrirane fenolne spojeve uključujući antocijane u rasponu od 300 do 700 mg/100 g suhe tvari (koji čine značajan udio ukupnih fenola i povećavaju antioksidativni potencijal komine) (Padmanabhan i sur., 2016), flavanole, flavonole i fenolne kiseline, uključujući hidroksicimetne kiseline (Veberić i sur., 2015; Rodriguez-Mateos i sur., 2012; Gavrilova i sur., 2011). Također, još neki pronađeni spojevi poput katehina, kvercetina, kafeinske i klorogenske kiseline imaju antioksidativna svojstva (Zou i sur., 2022).

#### *2.1.1.2. Antocijani*

Antocijani pripadaju skupini flavonoida koji su topljivi u vodi. Molekularna struktura antocijana karakteristična je struktura flavonoida  $C_6C_3C_6$ . Prema Brouillardu (1982), antocijani su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium odnosno flaviliji kationa koji je primarna komponenta antocijana. Glikozidi, odnosno antocijani vezani za molekule šećera, oblik su koji nalazimo u prirodi (Katalinić, 2011).



**Slika 2.** Promjena boje antocijana pod utjecajem pH (prema DDW Color, 2024)

Najznačajniji su pelargonidin, delphinidin, malvidin, peonidin, cijanidin i petunidin, koji u reakcijama sa šećerima glukozom, ramnozom, galaktozom i arabinozom čine najčešće glikozidne oblike. Razlikuju se prema stupnju hidroksilacije, a veći broj OH skupina, utječe na veći intenzitet boje (Herrera-Balandrano i sur, 2021). Borovnica sadrži visoke udjele malvidina i delphinidina (odgovoranih za tamno plavu boju), nakon kojih slijede petunidin, cijanidin i peonidin (Aliaño-González i sur., 2020).

Stabilnost antocijana, koji su prirodno nestabilni, ovisi o brojnim varijablama, uključujući strukturu spoja, prisutnost kisika, svjetlost, pH, temperaturu, enzime, askorbinsku kiselinu, šećere i kopigmente. Primjerice, veća hidroksilacija stabilizira pigment, dok metilacija smanjuje stabilnost (Mazza i Brouillard, 1987). Ovisno o pH otopine u kojoj su prisutni, antocijani pokazuju različitu stabilnost (indikator je promjena boje) (slika 2) (Castaneda-Ovando i sur., 2009; Brouillard, 1982). Kisik ubrzava oksidaciju, što često rezultira bezbojnim ili smeđim produktima (Jackman i sur., 1987). Stabilnost antocijana plodova borovnice nakon berbe osigurava se skladištenjem pri nižim temperaturama te bez utjecaja svjetla, dok prisutnost šećera i njihovih razgradnih produkata smanjuje njihovu stabilnost. Tijekom skladištenja mogu nastati smeđi produkti zbog interakcija antocijana s proizvodima razgradnje šećera i askorbinske kiseline (Krifi i Metche, 2001). Dodatno, kopigmenti, prirodni spojevi bogati elektronima, stabiliziraju ione flavilija, čime utječu na stabilnost antocijana (Brouillard, 1982).

Antocijani se koriste u hrani, kao nutraceutici, u farmaceutskim pripravcima i kao prirodna boja za tekstil. Upotreba antocijana kao prirodnih boja u prehrambenim proizvodima predlaže se kao alternativa te da se smanji upotreba umjetnih i sintetskih boja (Lao i Giusti, 2018).

Prema Veberiću i sur. (2015), tamno obojeno voće, poput borovnica, ima visok udio antocijana. Iako je sastav antocijana kod kultiviranih i samoniklih vrsta borovnica isti, njihove koncentracije mogu značajno varirati. Može i sur. (2011) utvrdili su da divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) sadrže ukupno  $1210,3 \pm 111,5$  mg cijanidin-3-glukozida (CYN-3-GLU)/100 g svježeg ploda, dok uzgojene borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) imaju znatno nižu koncentraciju od  $212,4 \pm 14,1$  mg CYN-3-GLU/100 g. Slične razlike u fenolnim spojevima

zabilježili su i Åkeström i sur. (2010), dok su Martz i sur. (2010) istraživali varijacije u fenolnom sastavu listova borovnica. Ove razlike utječu na antioksidacijsku sposobnost biljnog materijala, pri čemu su antocijani najjači antioksidansi prisutni u borovnicama, a njihove koncentracije na 100 g svježe mase variraju od 19,3 do 677,8 mg za cijanid-3-glukozid, 456,7 do 1406,3 mg za cijanid-3,5-glukozid i 101,88 do 195,01 mg za malvidin-3-glukozid (Koh i sur., 2020). Prema novijem istraživanju Hellström i sur. (2024) srednja vrijednost ukupnih antocijana europske borovnice iznosi  $48 \pm 8,9$  g/kg dok kod američkih borovnica ona iznosi  $17 \pm 7,1$  g/kg. Utvrđeno je da vrsta borovnice i uvjeti sušenja imaju značajan utjecaj na koncentraciju antocijana u komini borovnice. Ukupna koncentracija antocijana u američkim borovnicama i europskim borovnicama varira, ali prosječne vrijednosti u komini obično se kreću od 5 do 15 g/kg suhe tvari (Wang, 2024).

### 2.1.1.3. *Biološko djelovanje borovnice*

Borovnice su poznate po svojim brojnim biološkim djelovanjima koja su posljedica visokog sadržaja bioaktivnih spojeva. Ključna biološka djelovanja borovnice:

- Protuupalno djelovanje (Milbury i Kalt, 2010)
- Kardioprotektivno djelovanje (Rodriguez-Mateos i sur., 2013)
- Neuroprotektivno djelovanje (Joseph i sur., 1999)
- Antikancerogeno djelovanje (Zafra-Stone i sur., 2007)
- Poboljšanje inzulinske osjetljivosti (Stull i sur., 2010)
- Antioksidativno djelovanje (Giacalone i sur., 2011)

Plodove borovnice uz neke vrste povrća, orašastih plodova i čaja ubrajamo među najznačajnije izvore antioksidanata zahvaljujući značajnom udjelu vitamina C i E, beta-karotena, flavonoida i polifenola (Gündeşli i sur., 2019). Vitamini imaju ulogu u tjelesnom metabolizmu, što uključuje odgovor imunološkog sustava, sintezu neurotransmitera te rast i održavanje tkiva (Pico i sur., 2022). Budući da molekule antocijana imaju pozitivno nabijen atom kisika za razliku od drugih flavonoida, oni su snažniji i izrazitiji antioksidansi koji doniraju vodik te pokazuju brojne druge biološke aktivnosti (slika 3).

Hidroksilne skupine povezane s aromatskim prstenovima omogućuju im doniranje atoma vodika i neutralizaciju slobodnih radikala, čime ostvaruju antioksidativna djelovanja (Hou i sur., 2024). Slobodni radikali, kao nestabilni spojevi, mogu oštetiti stanice i uzrokovati oksidativni stres, što može dovesti do kroničnih bolesti poput dijabetesa, raka i kardiovaskularnih bolesti. Istraživanja pokazuju da prehrana bogata fenolima može pomoći u zaštiti organizma, poboljšanju zdravlja i smanjenju rizika od oksidativnog oštećenja i povezanih bolesti (Rossi i sur., 2022).



Plodovi borovnice u usporedbi s drugim vrstama bobičastog voća imaju viši udio bioaktivnih spojeva te posljedično izraženija antioksidativna djelovanja i velik potencijal primjene u prevenciji brojnih oboljenja (Rashidinejad, 2020). Dokazano je da redovita konzumacija borovnica štiti neurološki sustav od oksidativnog stresa. Antioksidansi u borovnicama imaju sposobnost neutralizacije štetnih djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta u organizmu. Zhao i sur. (2015) proveli su *in vivo* istraživanje korištenjem antocijanskog ekstrakta borovnice (AEB). Nakon oksidativnog stresa uzrokovanog akrilamidom, miševima je davano 250 mg/kg tjelesne težine AEB tijekom 14 dana. Primijećeno je da je AEB utjecao na smanjenje stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i povećao razinu glutaciona i povezane enzimske aktivnosti.



**Slika 3.** Funkcionalna svojstva antocijana borovnice (prema Duan i sur., 2022)

### 2.1.2. Komina borovnice

Borovnice su vrlo cijenjeno bobičasto voće, no svježe borovnice imaju kratak rok trajanja, te se prerađuju u voćne sokove, vino, ocat, džemove, sušene borovnice, pulpu u prahu, aditive za poboljšanje okusa i prirodna bojila koja se koriste u kolačima, keksima, kruhu, jogurtu i želeu (Duan i sur., 2022). Nakon prerade borovnica u sokove, zaostaje komina kao nusproizvod. Komina se sastoji od čvrstih dijelova ploda, poput kore i sjemenki, koji čine oko 20% težine svježeg voća. Iako je komina često smatrana otpadom, istraživanja su pokazala da obiluje vrijednim bioaktivnim spojevima među kojima se ističu fenoli i antocijani (Dabbou i sur., 2019). Zbog svojih antioksidativnih svojstava i povezanih zdravstvenih benefita, čine kominu borovnice vrijednom sirovinom za proizvodnju novih prehrambenih i funkcionalnih proizvoda, kao i zamjena za sintetske aditive. Ovaj sastav čini kominu posebno korisnom u razvoju funkcionalne hrane, što je potvrđeno istraživanjima koja ističu njenu visoku nutritivnu vrijednost i potencijalne zdravstvene koristi (Capaldi i sur., 2024; Šarić i sur., 2016).

Zhou i sur. (2018) istraživali su mogućnost iskorištavanja komine borovnice za proizvodnju proteina, saharida, antocijana i anorganskih soli. Za ovaj proces primijenili su mikrovalnu

hidrolizu i ekstrakciju, čime su uspješno izolirali ove vrijedne spojeve. Kao rezultat toga, komina borovnica može biti izvrsna sirovina za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Između 25% i 50% različitih polifenola bobičastog voća (Khanal i sur., 2009) nalaze se u komini borovnice, te se smatra da su zaslužni za potencijalne zdravstvene benefite koji im se pripisuju. Prema znanstvenim istraživanjima komina borovnice ima veću koncentraciju bioaktivnih spojeva od pulpe, uključujući fenole i antocijane. Pulpa sadrži okvirno samo 10 % ukupnih fenolnih spojeva, dok kožica i sjemenke sadrže 28-35 %, odnosno 60-70 %, što nusproizvod borovnice čini izvrsnim izvorom fenolnih spojeva (Bamba i sur., 2018).

Prema istraživanju koje su proveli Vulić i sur. (2011) o sadržaju polifenola u ekstraktu komine bobičastog voća, ekstrakt komine borovnice sadrži najveći udio ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana (1116,24 mg/100 g svježe komine, 1047,39 mg/100 g svježe komine odnosno 1279,49 mg/100 g svježe komine). Zbog visokog udjela sjemenki, komine bobičastog voća izvor su ulja jedinstvenog profila masnih kiselina, bogatih mononezasićenim i polinezasićenim masnim kiselinama. Blejan i sur. (2023) proveli su analizu komine europske borovnice, kupine i crnog ribizla i zaključili da iako se tri proučavana nusproizvoda nisu značajno razlikovala u ukupnom sadržaju PUFA (polinezasićene masne kiseline), komina borovnice bila je najbogatija n-3 PUFA. Također, komina borovnice pokazala je najviši sadržaj ukupnih fenola (36,7 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g s.tv.) i ukupnih antocijana (28,35 mg CYN-3-GLU/g s.tv.). Crveno obojeni prahovi dobiveni nakon sušenja i mljevenja proučavanih komina bobičastog voća sadrže značajne količine antocijana, što ih čini potencijalnim izvorom komponenti sa svojstvima bojila, koje mogu zamijeniti sintetske aditive.

Stoga, komina borovnice, kao izvor lipida i antioksidativnih spojeva, predstavlja izvrsnu bazu za razvoj i proizvodnju novih, visokovrijednih i funkcionalnih proizvoda. Uspješno izdvajanje fenola i drugih bioaktivnih molekula iz komine borovnice moglo bi rezultirati razvojem koji promiču zdravlje te poslužiti kao model za reintegraciju ovih vrijednih spojeva u prehrambeni lanac. Uspješno izdvajanje fenola i drugih bioaktivnih molekula iz komine borovnice može dovesti do razvoja novih visokovrijednih proizvoda koji mogu imati potencijalne korisne učinke na zdravlje. Također, ovi proizvodi mogu poslužiti kao inovativni sastojci za prehrambene formulacije, dodatke prehrani ili kozmetičke preparate. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na inovativne tehnologije prerade, koje omogućuju iskorištavanje i preradu nusproizvoda bobičastog voća u vrijedne sastojke i aditive, smanjujući tako njihov negativan utjecaj na okoliš te istovremeno zadovoljavajući potražnju za prirodnijom i zdravijom hranom.

## 2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Za izolaciju bioaktivnih spojeva iz komine borovnice, važno je odabrati odgovarajuću tehniku ekstrakcije i optimizirati parametre poput temperature, vrste i polarnosti otapala, omjera uzorka i otapala te vremena ekstrakcije. Istraživanja pokazuju da različite tehnike mogu značajno utjecati na iznos fenolnih spojeva koji se izdvajaju, uzimajući u obzir parametre poput vrste otapala, vremena i temperature ekstrakcije (Bamba i sur., 2018). Neke od tehnika za izolaciju polifenolnih spojeva iz borovnice su maceracija, hidrodestilacija, Soxhlet ekstrakcija i mehanička obrada korištenjem različitih otapala (Greensky Bio, 2024). Ove tradicionalne tehnike obično zahtijevaju dugotrajno vrijeme ekstrakcije s niskom učinkovitošću, kao i značajne količine organskih otapala te koriste visoke temperature koje mogu dovesti do razgradnje osjetljivih bioaktivnih molekula. Kao rezultat toga, raste potreba za razvijanjem i primjenom metoda ekstrakcije koje su ekološki prihvatljive i koriste manje energije i organskih otapala, zahtijevaju kraće vrijeme ekstrakcije, imaju veću selektivnost prema ciljanim spojevima te su. Sukladno navedenom, sve se više koriste napredne tehnike ekstrakcije kao što su ultrazvuk, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem, ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub>, ekstrakcija eutektičkim otapalima uz pomoć mikrovalova i ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (Pavlović, 2020). Borovnice sadrže velike količine fenolnih spojeva, kao i veću koncentraciju antocijana od drugog bobičastog voća, pri čemu u komini zaostaje najveća količina pa je potrebno odabrati adekvatnu metodu ekstrakcije kako bi se takvi spojevi što efikasnije izolirali iz biljnog materijala.

### 2.1.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Korištenje mikrovalne energije u kemijskim laboratorijima prvi su opisali 1986. godine Gedye i Giguere u organskoj sintezi i Ganzler (1990) u ekstrakciji bioloških matrica za pripremu analitičkih uzoraka. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je sofisticirana tehnika koja se bazira na primjeni energije mikrovalova za zagrijavanje smjese otapala i supstrata s ciljem ekstrakcije ciljanih molekula iz iz staničnih struktura biljnog materijala (Koubaa i sur., 2015).

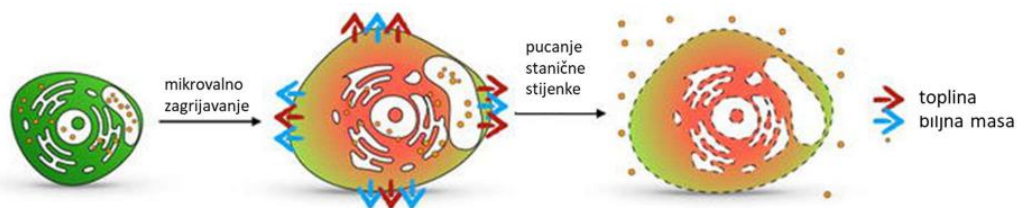
MAE koristi energiju mikrovalova za ubrzano zagrijavanje uzorka i otapala, što omogućava bržu i učinkovitiju ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Mikrovalovi, s frekvencijama u rasponu od 300 MHz do 300 GHz, stupaju u interakciju s materijalima na različite načine: neprozirni materijali poput metala reflektiraju ih, prozirni materijali poput stakla propuštaju ih, a apsorbirajući materijali pretvaraju ih u toplinu (Routray i Orsat, 2012). Ionska kondukcija i rotacija dipola dvije su metode kojima se energija prenosi tijekom mikrovalnog zagrijavanja. Ioni se kreću kada se na njih primijeni elektromagnetsko polje; ovaj proces je poznat kao ionska kondukcija, a trenje koje stvara otpor otopine na protok iona zagrijava

otopinu. Pokušaj dipolnih molekula da se poravnaju s izmjeničnim električnim poljem koje stvaraju mikrovalovi u mediju poznat je kao rotacija dipola. Toplina se oslobađa kao rezultat vrtnje dipola što uzrokuje sudaranje njegovih molekula. Oba procesa odvijaju se istovremeno, ali temperatura u konačnici određuje hoće li mehanizam grijanja biti učinkovit (Veggi i sur., 2012). Zagrijavanje je u početku uglavnom uzrokovano rotacijom dipola, ali kako temperatura raste, vodljivost iona postaje sve važnija. Mikrovalovi omogućuju ciljano i selektivno zagrijavanje čime se sprječava gubitak topline za razliku od konvencionalnih metoda gdje se značajan dio toplinske energije gubi i odlazi u okoliš. Faktor dielektričnog rasipanja ( $\tan \delta$ ), koji predstavlja mjeru kapaciteta otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i prenese je kao toplinu na okolne molekule, određuje koliko se učinkovito određena otapala zagrijavaju pod mikrovalovima (Zuloaga i sur., 1999).

MAE nudi brojne prednosti u usporedbi s konvencionalnim tehnikama, uključujući učinkovito i selektivno grijanje, korištenje obnovljivih izvora energije, te bržu i energetski učinkovitiju ekstrakciju. Povećava prinos, skraćuje vrijeme ekstrakcije za 75-80 %, smanjuje potrošnju energije za 25-50 %, te smanjuje proizvodne troškove minimiziranjem otpada (Vinatoru i sur., 2017; Li i sur., 2013).

#### 2.1.3.1. Utjecaj parametara MAE na izolaciju bioaktivnih molekula

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima može se provoditi bez otapala za izolaciju hlapljivih spojeva ili uz primjenu otapala za izdvajanje nehlapljivih spojeva. Mikrovalna energija zagrijava cijeli volumen materijala, stvarajući unutarnji pritisak koji uzrokuje oštećenje staničnih stijenki, čime se omogućava prijenos mase i ekstrakcija ciljnih spojeva. Proces uključuje prodiranje otapala, difuziju spojeva iz biljnih čestica i otpuštanje tih spojeva u masu otapala, čemu mikrovalna energija doprinosi povećanjem pritiska unutar stanica i poboljšanjem difuzije spojeva povećavajući učinkovitost ekstrakcije (Vinatoru i sur., 2017; Saleh i sur., 2016).



**Slika 4.** Shematski prikaz pucanja biljne stanice (prema Cavalloro i sur., 2021)

Temperatura je jedan od ključnih čimbenika koji utječe na učinkovitosti izolacije fenola iz različitih biljnih matriksa. Povećanjem temperature potiče se difuzija, smanjuje viskoznost otapala i povećava topljivost fenola, što posljedično utječe na učinkovitiju i bržu ekstrakciju. Energija mikrovalova dodatno pojačava toplinsku difuziju unutar uzorka, omogućujući brže i učinkovitije oslobađanje spojeva. Međutim, viša temperatura nosi rizik razgradnje termolabilnih

spojeva poput antocijana, čime se smanjuje njihova stabilnost i učinkovitost. Stoga je ključno optimizirati temperaturu i vrijeme ekstrakcije kako bi se postigla ravnoteža između maksimalnog prinosa i očuvanja bioaktivnosti spojeva (Zhao, 2018; Lovrić i sur., 2017).

Također, odnos otapala i uzorka značajno utječe na učinkovitost ekstrakcije. Veći omjer, odnosno veći volumen otapala olakšava difuziju otapala i interakciju s bioaktivnim spojevima, ali prekomjerna količina otapala može smanjiti učinkovitost zagrijavanja smjese energijom mikrovalova i povećati operative troškove. Optimalan omjer uzorka i otapala mora osigurati dovoljnu koncentraciju otapala za učinkovito izdvajanje bez negativnog utjecaja na selektivnost i ekonomičnost postupka (Rezaei i sur., 2013).

Predobrade poput mljevenja (Chupin i sur., 2015), enzimske obrade (Yang i sur., 2010) ili odmaščivanja (Rodríguez-Rojo i sur., 2012) mogu značajno poboljšati pristupačnost ciljanih spojeva unutar biljnog matriksa. Nadalje, kombinacija MAE s tehnikama poput ultrazvučne ekstrakcije (Pongmalai i sur., 2015) ili ekstrakcije pod povišenim tlakom (Ortiz i sur., 2004) može dodatno povećati prinose bioaktivnih spojeva, što čini MAE prilagodljivom tehnologijom za industrijsku primjenu (Chupin i sur., 2015; Rodríguez-Rojo i sur., 2012).

Troncoso Mesa i sur. (2021) optimizirali su MAE za izolaciju polifenola i antioksidativnih spojeva iz komete borovnice, analizirajući utjecaj koncentracije etanola, primjenjene tehnike ekstrakcije i snage mikrovalova. Pri optimalnim uvjetima, postignut je sadržaj fenola od 426,19 mg GAE/100 g, antocijana 389,64 mg CYN-3-GLU/100 g te antioksidativni kapacitet od 654,11 mg TE/100 g, čime je pokazano da se MAE može koristiti za učinkovito izdvajanje bioaktivnih spojeva.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak komine borovnice

Kao materijal u istraživanju korišten je komercijalno dostupna europska borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.), poznata i kao divlja borovnica, proizvođača Camposol, 1.klasa, serija L-52-02.



**Slika 5.** Postupak liofilizacije (vlastita fotografija)

Koristeći sokovnik na hladno prešanje (VerVita HU-100, Dong Ah Ind. Co., Ltd., Korea) proizveden je sok borovnice te je kao nusproizvod dobivena komina koja je korištena u ovom istraživanju. Dobivena komina stavlja se u zamrzivač na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 sata, nakon čega se liofilizira tijekom 48 sati na  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Alpha 1–4 LSCPlus, Osterode am Harz, Njemačka) (slika 5) do postizanja sadržaja vlage nižeg od 3 % određeno analizatorom vlage. Osušena komina borovnice samelje se električnim mlincem, pakira u staklenu ambalažu i čuva na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do provođenja ekstrakcije.



**Slika 6.** Uzorak komine borovnice (vlastita fotografija)

### 3.1.2. Kemikalije i standardi

#### Kemikalije za ekstrakciju fenolnih spojeva

- Ekstrakcijsko otapalo: 1 % mravlja kiselina (Honeywell, Offenbach na Majni, Njemačka) u 50 % vodenoj otopini etanola

#### Reagensi za određivanje ukupnih fenola

- Destilirana voda
- Etanol, 96 %  $C_2H_6O$ , Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Metanol, 100 %  $CH_3OH$ , Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

*Priprema:* U 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijevog karbonata ( $Na_2CO_3 \times 10H_2O$ , Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska), koji se zatim ostavi da se ohladi na sobnu temperaturu. Nakon toga se u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda nekoliko kristalića natrijevog karbonata i filtrira nakon 24 sata.

- Standard galne kiseline ( $C_6H_2(OH)_3COOH$ , Sigma-Aldrich, Njemačka)

*Priprema:* Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese i otopi u odmjernoj tikvici volumena 100 mL, koja se potom do oznake nadopuni destiliranom vodom.

#### Reagensi za određivanje antocijana

- Kalijev kloridni pufer pH 1 (KCl 0,025 M)

*Priprema:* Kalijev klorid (KCl, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) mase 1,86 g najprije se odvaži u plastičnu lađicu za vaganje, a zatim kvantitativno prenese u staklenu čašu od

1 L koja je prethodno temeljito isprana deioniziranom vodom. Za otapanje odvage se dodajte 980 mL deionizirane vode. Izmjeri se pH otopine i korigira na vrijednost 1,0 ( $\pm 0,05$ ) pomoću klorovodične kiseline (37 % HCl, CARLO ERBA Reagents S.A.S., DASIT GROUP, Njemačka), uz utrošak otprilike 6,3 mL u procesu. Nakon što je otopina pripravljena i podešena na pH 1,0, prebaci se u odmjernu tikvicu od 1 L.

- Natrijev acetatni pufer pH 4,5 ( $C_2H_3NaO_2$ , 0,4 M)

*Priprema:* Natrijev acetat trihidrat ( $CH_3CO_2Na \times 3H_2O$ , Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) mase 54,43 g odvaže se u staklenu čašu od 100 mL i zatim kvantitativno prenese u staklenu čašu od 1 L koja je temeljito isprana deioniziranom vodom. U odvagu se dodaje 960 mL deionizirane vode koja se zatim otopi. Izmjeri se pH otopine i korigira vrijednost na 4,5 ( $\pm 0,05$ ) pomoću klorovodične kiseline (37 % HCl, CARLO ERBA Reagents S.A.S., DASIT GROUP, Njemačka), uz utrošak od otprilike 20 mL u procesu. Nakon što je otopina pripravljena i podešena na pH 4,5, prebaci se u odmjernu tikvicu od 1 L.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (HCl, (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- Klorovodična kiselina (40 mM)

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

- TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (10 mM) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)

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

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $FeCl_3 \times 6H_2O$ ) (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (20 mM otopina)

*Priprema:* Odvaže se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj ladici 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, Cornaredo, Italija)
- Acetatni pufer (0,3 M), pH 3,6

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

- FRAP reagens

*Priprema:* U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se



promiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $K_2S_2O_8$   
*Priprema:* 0,1892 g  $K_2S_2O_8$  (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) izvaže se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.
- 7mM ABTS otopina (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina))  
*Priprema:* 0,0192 g ABTS reagensa se otopi u tikvici od 5 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake na tikvici.
- Stabilna ABTS•+ otopina  
*Priprema:* 88  $\mu$ L  $K_2S_2O_8$  otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija  $K_2S_2O_8$  pri tome je 2,45 mmol L<sup>-1</sup>.
- 1 %-tna otopina ABTS•+  
*Priprema:* Na dan provođenja analiza, u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 1000  $\mu$ L ABTS+ otopine 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. Laboratorijska oprema i pribor

- Liofilizator (Alpha 1–4 LSCPlus, Osterode am Harz, Germany)
- Analizator vlage OHAUS - MB23 (Ohaus, New Jersey, SAD)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska)
- Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima (ETHOS X, Milestone, Bergam, Italija)
- Analitička vaga, (model: AX224; OHAUS; Kina)
- Spektrofotometar, (model: UV-16600 PC; VWR International, USA)
- Staklene kivete
- Vortex (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Vodena kupelj
- Automatske pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL)
- Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL 100 mL, 1 L)
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Falconice, volumena 50 mL
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Pipeta, volumena 15 mL

- Propipeta
- Stakleni lijevak
- Metalne žličice
- Boca od tamnog stakla, volumena 50 mL
- Stakleni štapići
- Aluminijska folija
- Kivete

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom MAE

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine borovnice provodi se primjenom MAE. Ovaj postupak provodi se korištenjem uređaja ETHOS X prikazanog na slici 7, (Milestone, Bergam, Italija) prema planu eksperimenta (tablica 1). U svaku ćeliju se prije ekstrakcije dodaje uzorak u zadanoj količini prema planu eksperimenta, magnet te 40 mL ekstrakcijskog otapala. Korišteno otapalo bila je 50 % otopina etanola zakiseljena s 1 % vodenom otopinom mravlje kiseline. Ćelije se postavljaju u uređaj te se podese zadani parametri.



**Slika 7.** Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima (vlastita fotografija)

Varirani parametri ekstrakcije su vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min), temperatura (40 °C , 60 °C, 80 °C) i omjer biljnog materijala i otapala (20 mL/g = 2,5 g; 40 mL/g = 1,25 g; 60 mL/g = 0,83 g). Fiksni parametri ekstrakcije bili su: snaga mikrovalova od 800 W, miješanje od 50 % te hlađenje nakon ekstrakcije od 1 min.

**Tablica 1.** Plan eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine borovnice primjenom MAE

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)	OMJER OTAPALO/UZORAK (mL/g)
1	40	5	20
2	40	5	40
3	40	5	60
4	40	10	20
5	40	10	40
6	40	10	60
7	60	5	20
8	60	5	40
9	60	5	60
10	60	10	20
11	60	10	40
12	60	10	60
13	80	5	20
14	80	5	40
15	80	5	60
16	80	10	20
17	80	10	40
18	80	10	60

Ekstrakti dobiveni prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1 se se profiltriraju u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake. Dobiveni ekstrakti se skladište na 4 °C u hladnjaku do provođenja analiza, a koriste se za određivanje udjela ukupnih fenola, antocijana i antioksidacijskog kapaciteta.

### 3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

#### *Princip određivanja:*

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na obojenoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je kombinacija fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Kada se fenolni spojevi oksidiraju u blago alkalnim uvjetima, gore spomenute kiseline se reduciraju u plavo obojeni wolframov oksid i molibdenov oksid. Mjereno spektrofotometrijski na valnoj duljini od 765 nm, plavo obojenje—čiji se intenzitet povećava s brojem hidroksilnih ili oksidacijskih skupina fenolnih spojeva prisutnih u uzorku—koristi se za određivanje koncentracije ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu uzorka (Shortle i sur., 2014).

#### *Priprema uzorka:*

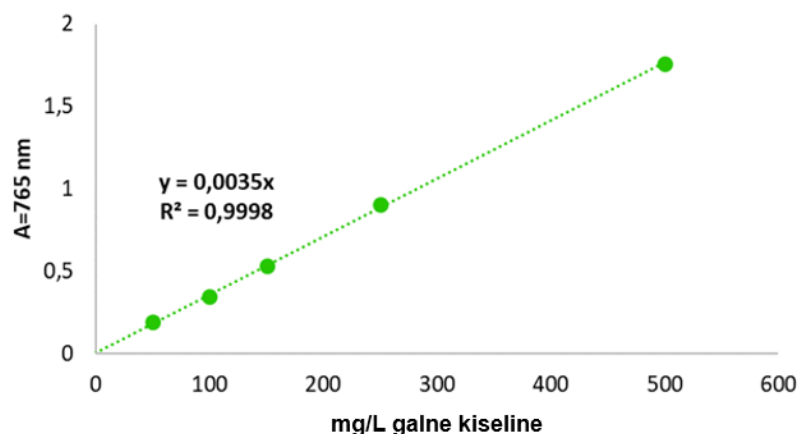
Ekstrakt komine borovnice mora se prema potrebi razrijediti ekstrakcijskim otapalom kako bi se odredio ukupni sadržaj fenola.

#### *Postupak određivanja:*

100 µL ekstrakta pomiješa se s 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon 3 minute 1 mL otopine natrijeva karbonata. Pripremljeni uzorci se miješaju u Vortex mikseru i potom termostatiraju 25 minuta na 50 °C. Zatim se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm. Priprema slijepa probe je identična, ali se umjesto ekstrakta koristi 100 µL otapala za ekstrakciju. Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE/g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Od bazične otopine galne kiseline (5 mg/L) napravljeno je nekoliko razrjeđenja s destiliranom vodom: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Nakon toga se u staklenu epruvetu otpipetira 100 µL svakog od prethodno pripremljenih koncentracija galne kiseline, 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i nakon 3 minute 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Umjesto galne kiseline, u slijepoj probi nalazi se 100 µL destilirane vode. Pripremljeni uzorci se sjedine u Vortex mikseru i zatim se zagrijavaju na 50 °C 25 minuta u vodenoj kupelji. Zatim se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm, a pomoću programa Microsoft Excel se iz izmjerenih vrijednosti crta baždarni pravac. Opažene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm nanese su na ordinatu, a koncentracije galne kiseline (mg/L) na apscisu vodoravne crte. Izračunata jednadžba pravca koristi se za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola [1] (slika 8):



**Slika 8.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Jednadžba pravca:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad (R^2 = 0,9998) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

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

### 3.2.3. Određivanje antocijana

*Postupak određivanja monomernih antocijana:*

Staklene epruvete u kojima se postavlja reakcija pripremaju se tako da se za mjerenje jednog uzorka pripreme dvije epruvete. Pomoću automatizirane pipete otpipetira se po 1 mL pripremljenog uzorka u svaku epruvetu. Zatim se dodaje 4 mL pufera pH 1,0 u jednu epruvetu i 4 mL pufera pH 4,5 u drugu epruvetu. Nakon što su pripremljene otopine ostavljene 20 minuta, izmjerena je apsorbancija na 520 nm i 700 nm. Slijepu probu čine puferi (kalijev kloridni pufer pH 1 i natrijev acetatni pufer pH 4,5) koji se dodaju u epruvete s ekstraktima. Rezultati udjela ukupnih antocijana izraženi su kao ekvivalent cijanidin-3-glikozida (CYN-3-GLU).

*Račun:*

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$\frac{A * MW * DF * 10^3}{\epsilon * l} \quad [2]$$

gdje je:

A = (A<sub>520nm</sub> – A<sub>700nm</sub>)<sub>pH=1,0</sub> - (A<sub>520nm</sub> – A<sub>700nm</sub>)<sub>pH=4,5</sub>

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 g/mol)

DF = faktor razrijeđenja

10<sup>3</sup>= faktor za preračunavanje g u mg

ε = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid 26900 L/mol cm)

l = debljina kivete (1 cm)

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

#### *Princip određivanja:*

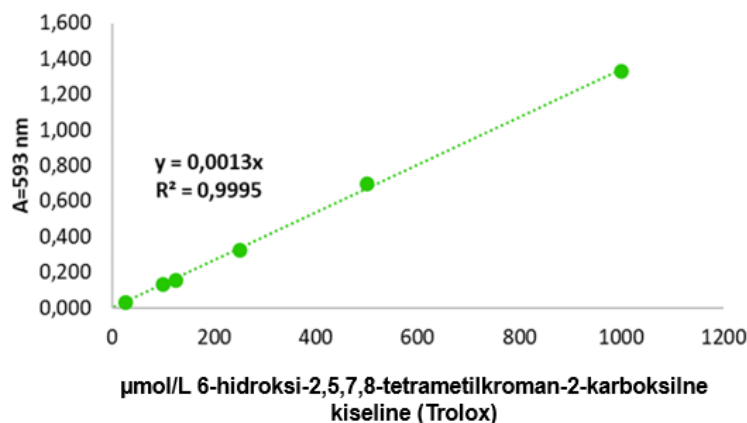
Reakcija redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju osnova je FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode. Ova reakcija stvara plavo obojeni fero-tripiridil-triazin kompleks, koji ima maksimum apsorpcije na 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FeSO<sub>4</sub>, askorbinska kiselina ili Trolox ekvivalenta najčešći su načini na koje se izražavaju vrijednosti FRAP (Benzie i Strain, 1996.)

#### *Postupak određivanja:*

Otpipetiranje u staklene epruvete provodi se redom: 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa nakon čega se promiješa (Vortexom) i termostatira 5 minuta na temperaturi od 37 °C. Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm. U slijepoj probi je prisutno sve osim uzorka koji je zamijenjen ekstrakcijskim otapalom.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Izvaže se 0,0501 g Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) da se dobije 2 mM otopine za izradu baždarnog pravca. Kvantitativno, odvaga se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i napuni 96 %-tnim etanolom do oznake. Pipetiranje alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu od 10 mL odvija se redom od 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL što omogućuje pripremu razrjeđenja iz pripremljene otopine Troloxa. Zatim se u odmjerne tikvice do oznake nadopune 96 %-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tikvicama redom iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 μmol/L. Zatim se u staklene epruvete redom otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL standardne otopine iz već pripremljenih odmernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Slijedi miješanje (Vortexom) i termostatiranje na temperaturi od 37 °C. Apsorbancija se mjeri na 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka koji je zamijenjen 96 %-tnim etanolom. Pomoću programa Microsoft Excel iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije kreira se baždarni pravac pri čemu se zabilježene vrijednosti apsorbanacije na 593 nm nalaze na ordinati, a koncentracije Troloxa (μmol/L) na apscisi (slika 9). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom.



**Slika 9.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

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

$R^2$  – koeficijent determinacije

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

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### *Princip određivanja:*

ABTS metoda temelji se na sposobnosti molekula antioksidansa da reduciraju stabilni kationski radikal 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ). Antioksidansi uzrokuju redukciju stabilnog  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  kationa u ABTS, što se u reakciji manifestira kao obezbojenje plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Dobivene vrijednosti za apsorbanciju uzorka dobivenih  $\text{ABTS}^+$  metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju kao Trolox ekvivalenti (TE).

#### *Priprema uzorka:*

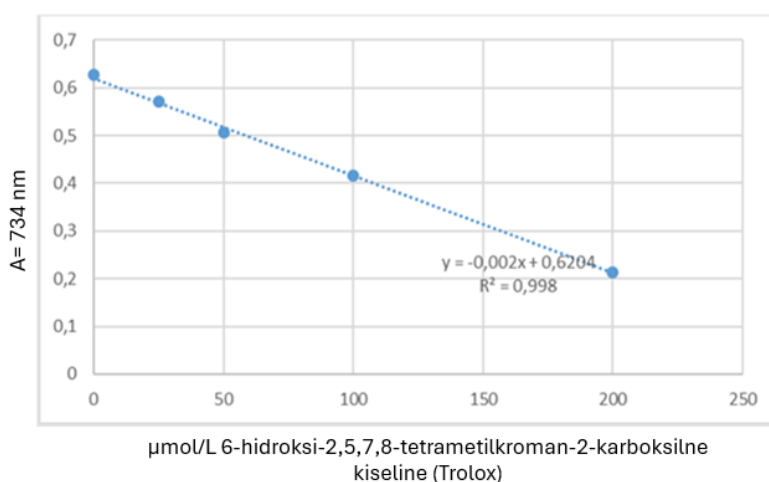
Ekstrakt komine borovnice razrijedi se ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

#### *Postupak određivanja:*

160  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka pomiješa se s 2 mL 1 %-tnog  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka koristi se 96 %-tni etanol.

### Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca izvaže se 500 mg Troloxa u plastičnoj lađici, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, a zatim se do vrha napuni 100 %-tnim metanolom kako bi se dobila standardnu otopinu Troloxa od 0,02 mol/L. Razrjeđenja se prave iz standardne otopine u koncentracijama od 25, 50, 100 i 200  $\mu\text{mol/L}$  pipetiranjem redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se zatim nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. U eprivete se odpipetira 160  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa u koju se doda 2 mL 1% ABTS $\bullet\bullet$ , ostavlja se da odstoji 1 min nakon čega se mjeri apsorbanacija na 734 nm. Baždarni pravac se crta iz dobivenih vrijednosti apsorbanacija na način da se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 734 nm. Antioksidativni kapacitet uzorka određen je pomoću dobivene jednadžbe pravca (slika 10) [3]:



**Slika 10.** Prikaz ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Jednadžba pravca:

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

gdje je:

Y – apsorbanacija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine  $\mu\text{M}$

R2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u  $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.6. Obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijalni dizajn na dvije odnosno tri razine. Kao nezavisne varijable promatrani su parametri temperature, vremena ekstrakcije i omjera otapalo:uzorak, dok su zavisne varijable bile prinos fenola, antocijana i antioksidacijski kapacitet. Dobiveni podaci testirani su na normalnost i



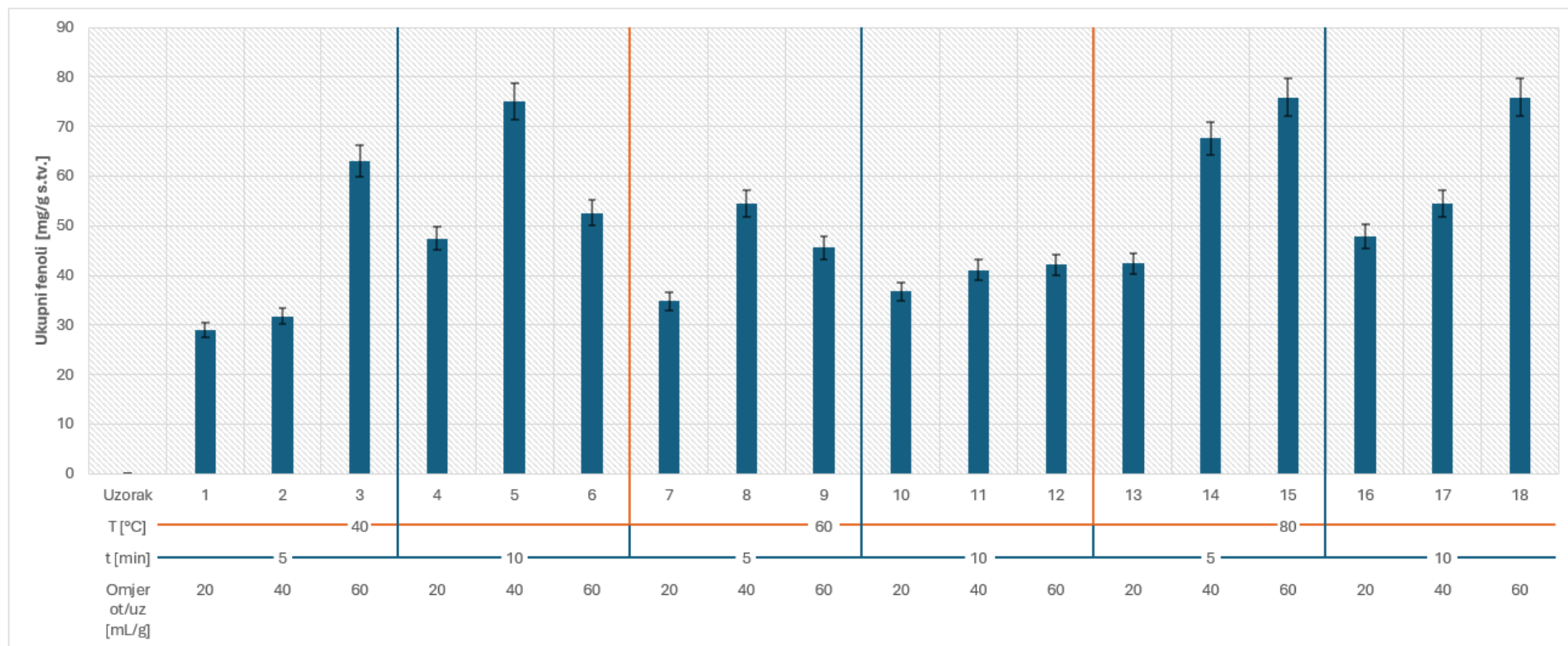
homoskedastičnost, a podaci koji su udovoljili uvjetima analizirani su pomoću jednosmjerne analize varijance ANOVA, a višestruko uspoređivanje provedeno je Tukey HSD testom. Podaci koji nisu udovoljili uvjetima, analizirani su neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom s višestrukim usporedbama srednjih rangova. Razina značajnosti iznosila je  $p \leq 0,05$  s intervalom pouzdanosti od 95%.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj parametra MAE na prinos fenola, antocijana i antioksidacijski kapacitet ekstrakta komete borovnice. Promjenjivi parametri ekstrakcije bili su temperatura 40, 60 i 80 °C, vrijeme ekstrakcije 5 i 10 min, te omjeri otapalo:uzorak 20, 40 i 60 mL/g. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski je određen ukupni udio fenola i antocijana te antioksidacijski kapacitet FRAP i ABTS metodama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija, dok je utjecaj uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih fenola, antocijana i antioksidacijski kapacitet prikazan u tablici 2.

### 4.2.1. Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih fenola

Ukupni fenoli predstavljaju važnu skupinu bioaktivnih spojeva u komini borovnice, a poznati su po svojim snažnim antioksidativnim svojstvima. Kao što je opisano u ovom istraživanju ekstrakcija fenola iz komete borovnice provedena je primjenom tehnike ekstrakcije koja omogućava učinkovito izdvajanje fenolnih spojeva, zadržavajući istovremeno njihovu stabilnost. Nakon provedenih analiza koncentracija ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima ekstrakta komete borovnice određena je u rasponu od 28,93 mg GAE/g s.tv. do 75,86 mg GAE/g s.tv. komete (slika 11) s ukupnom prosječnom vrijednošću 50,99 mg GAE/g komete (tablica 2). Najmanja koncentracija ukupnih fenola dobivena je u uzorku 1 pri 40 °C, vremenu ekstrakcije od 5 min te omjeru otapalo:uzorak 20 mL/g, dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku 18 pri 80 °C, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru otapalo:uzorak 60 mL/g.



**Slika 11.** Udio ukupnih fenola u uzorcima ekstrakta komete borovnice dobivenih primjenom MAE

**Tablica 2.** Utjecaj uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih fenola, antocijana i antioksidacijski kapacitet

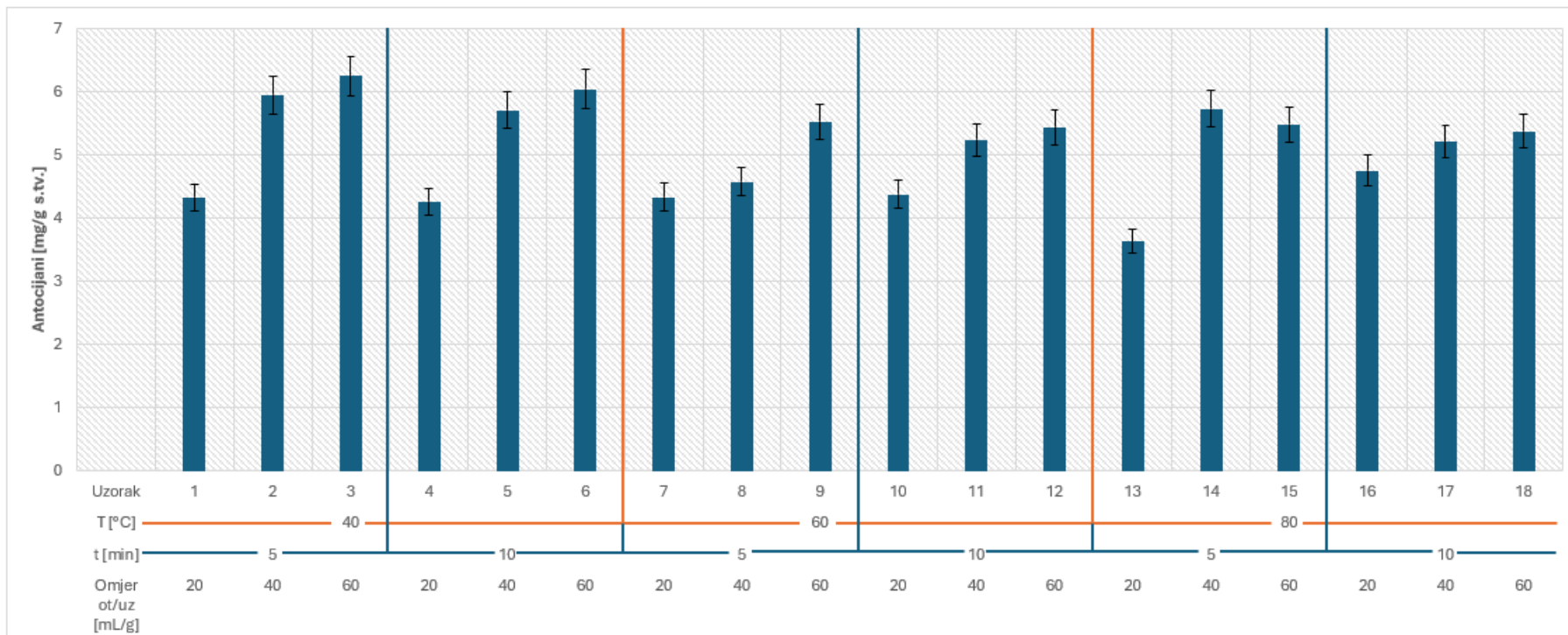
Izvor varijacije	N	Ukupni fenoli (mg GAE/g s.tv.)	Antocijani (mg CYN-3- GLU/g s.tv.)	FRAP ( $\mu$ mol TE/g s.tv.)	ABTS ( $\mu$ mol TE/g s.tv.)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		p<0,01*	p<0,01*	p=0,26	p<0,01*
1:20	12	39,69 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	4,19 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	231,56 $\pm$ 17,10 <sup>a</sup>	286,62 $\pm$ 16,78 <sup>a</sup>
1:40	12	54,10 $\pm$ 4,43 <sup>b</sup>	5,29 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	285,15 $\pm$ 28,19 <sup>a</sup>	498,02 $\pm$ 37,73 <sup>b</sup>
1:60	12	59,17 $\pm$ 4,10 <sup>b</sup>	5,56 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	328,29 $\pm$ 54,28 <sup>a</sup>	617,95 $\pm$ 41,91 <sup>c</sup>
Temperatura (°C)		p<0,01*	p=0,26	p<0,01*	p=0,99
40	12	49,81 $\pm$ 4,91 <sup>a</sup>	5,31 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	179,20 $\pm$ 23,01 <sup>a</sup>	518,68 $\pm$ 60,73 <sup>a</sup>
60	12	42,47 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>	4,81 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	329,28 $\pm$ 44,02 <sup>b</sup>	421,11 $\pm$ 41,36 <sup>a</sup>
80	12	60,69 $\pm$ 4,06 <sup>b</sup>	4,92 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	336,54 $\pm$ 23,64 <sup>b</sup>	462,80 $\pm$ 52,38 <sup>a</sup>
Vrijeme (min)		p=0,52	p=0,78	p=0,79	p=0,49
5	18	49,37 $\pm$ 3,85 <sup>a</sup>	4,98 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	275,77 $\pm$ 29,32 <sup>a</sup>	446,43 $\pm$ 44,34 <sup>a</sup>
10	18	52,60 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>	5,04 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	287,56 $\pm$ 32,57 <sup>a</sup>	488,63 $\pm$ 41,01 <sup>a</sup>
Prosječna vrijednost	36	50,99	5,12	281,67	467,53

\*statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelija označene različitim slovima su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ .  
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Iz rezultata se može zaključiti da se koncentracija ukupnih fenola statistički značajno razlikuje ( $p < 0,01$ ) ovisno o omjeru uzorak:otapalo i primijenjenoj temperaturi ekstrakcije, dok vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajniji utjecaj. Prilikom povećanja udjela otapala sa 20 mL/g ( $39,69 \pm 2,09$  mg GAE/g s.tv. komine) na 40 mL/g ( $54,10 \pm 4,43$  mg GAE/g s.tv. komine) dolazi do povećanog izdvajanja ukupnih fenola iz uzoraka, dok povećavanje udjela otapala sa 40 mL/g na 60 mL/g ne pokazuje značajnije povećanje prinosa ukupnih fenola. Također, prinosi ukupnih fenola su se neznatno povećali uslijed povišenja temperature sa 40 °C na 60 °C, a pokazalo se da zabilježeno povećanje nije bilo statistički značajno. Povećanjem temperature sa 60 °C ( $42,47 \pm 1,96$  mg GAE/g s.tv. komine) na 80 °C ( $60,69 \pm 4,06$  mg GAE/g s.tv. komine) bilježimo statistički značajniji porast koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima komine borovnice.

Capaldi i sur. (2024) proveli su eksperimentalno istraživanje o utjecaju različitih temperatura MAE (80, 100, 125 i 150 °C) na ekstrakciju ukupnih fenola iz komine borovnice i zaključili da se povećanjem temperature povećava i udio ekstrahiranih ukupnih fenola sa najvećim prinosom ostvarenim pri 150 °C (13,06 odnosno 12,53 mg GAE/g). Istraživanje ove grupe autora u skladu je s našim istraživanjem gdje se također pokazalo da se pri višim temperaturama ostvaruju veći prinosi ukupnih fenola. Navedeno se može objasniti činjenicom da povećanjem temperature kod MAE dolazi do generiranja toplinske energije unutar biljnog materijala, posljedično do brže kinetike ekstrakcije, što rezultira pucanjem staničnih stijenki te oslobađanjem fenola i učinkovitijim prijenosom u ekstrakcijsko otapalo. Prethodno spomenuta grupa autora također navodi da se povećanjem omjera uzorak:otapalo (npr. s 1:10 na 1:30 mL/g) povećava ukupni sadržaj fenola do određene granice, nakon čega daljnje povećanje ne rezultira značajnim porastom prinosa fenola, što je također u skladu s našim istraživanjem. Ovo se pripisuje zasićenju otapala fenolnim spojevima, gdje dodatno povećanje otapala ne utječe na učinkovitost ekstrakcije. Generalno, koncentracije fenolnih spojeva u ekstraktima komine borovnice istraživanih u našem radu više su u odnosu na one dobivene u radu Capaldi i sur. (2024), a što je posljedica korištenja različitog otapala te različitih parametara MAE.

#### 4.2.2. Utjecaj parametara MAE na udio antocijana

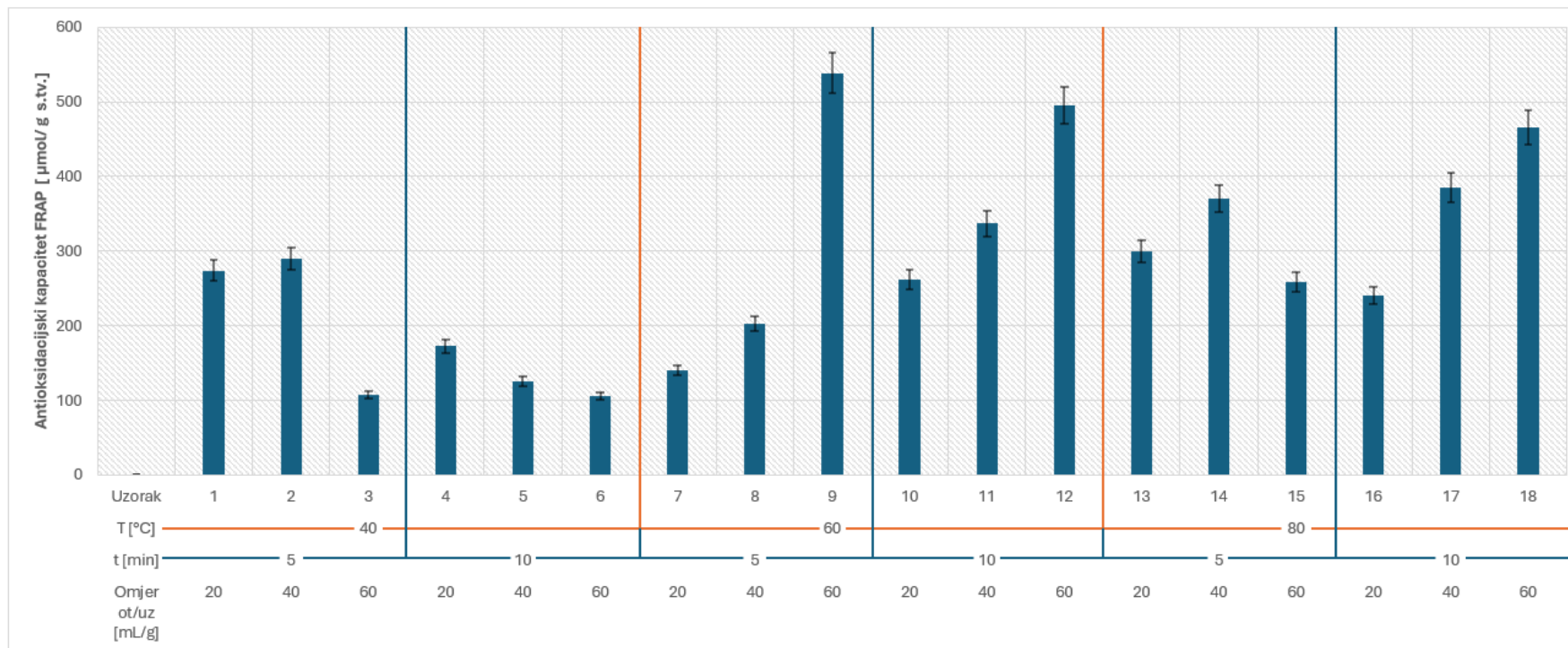


Slika 12. Udio antocijana u uzorcima ekstrakta komine borovnice dobivenih primjenom MAE

Antocijani su jedna od najzastupljenijih skupina bioaktivnih spojeva prisutnih u komini borovnice, a odgovorni su za intenzivnu plavo-ljubičastu boju plodova. Pripadaju skupini flavonoida i poznati su po svojim antioksidativnim svojstvima, koja pomažu u neutraliziranju slobodnih radikala, čime doprinose smanjenju oksidativnog stresa i rizika od kroničnih bolesti (Kalt i sur., 2001). Nakon provedenih analiza koncentracija antocijana u ispitivanim uzorcima ekstrakta komine borovnice određena u rasponu od 3,63 mg CYN-3-GLU/g s.tv. komine do 6,25 mg CYN-3-GLU/ g komine (slika 12) s ukupnom prosječnom vrijednošću 5,12 mg CYN-3-GLU/g s.tv. komine (tablica 2). Najmanja koncentracija antocijana dobivena je u uzorku 13 pri 80 °C, vremenu ekstrakcije od 5 min te omjeru otapalo:uzorak 20 mL/g, dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku 3 pri 40 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapalo:uzorak 60 mL/g. Iz rezultata se može zaključiti da se koncentracija antocijana statistički značajno razlikuje ( $p < 0,01$ ) ovisno o omjeru uzorak:otapalo, dok vrijeme ekstrakcije i primijenjena temperatura nisu imali statistički značajniji utjecaj. Prilikom povećanja udjela otapala sa 20 mL/g ( $4,19 \pm 0,11$  mg CYN-3-GLU/g s.tv. komine) na 40 mL/g ( $5,29 \pm 0,14$  mg CYN-3-GLU/g s.tv. komine) dolazi do povećanog izdvajanja antocijana iz uzoraka, dok povećavanje udjela otapala sa 40 mL/g na 60 mL/g ne pokazuje značajnije povećanje prinosa antocijana.

Bamba i sur. (2018) analizirali su korištenje MAE za izolaciju bioaktivnih spojeva iz komine borovnice prilikom čega je utvrđeno da povećanje omjera uzorak:otapalo (od 1:10 do 1:40 mL/g) značajno utječe na povećanje prinosa antocijana. Njihovi rezultati su u skladu i sa istraživanjem Čujića i sur. (2016) koji su istraživali bobice aronije. U njihovom istraživanju, omjer uzorak:otapalo varirao je između 1:10 i 1:30 mL/g. Uočeno je da se udio ukupnih fenola i antocijana stabilizirao između omjera 1:20 i 1:30 mL/g. Iako je na omjeru 1:30 mL/g zabilježen neznatan pad udjela antocijana, taj pad nije bio statistički značajan. U istraživanju Wena i sur. (2015), koje se bavilo ekstrakcijom antocijana iz kupine, analizirani su omjeri uzorak:otapalo u rasponu od 1:5 do 1:25 mL/g. Rezultati su pokazali da se udio antocijana povećavao s većim omjerom uzorak:otapalo, dosegnuvši vrhunac pri omjeru od 1:20 mL/g. Daljnje povećanje omjera rezultiralo je tek neznatnim povećanjem koncentracije antocijana, što ukazuje na postizanje ekstrakcijskog maksimuma pri tom omjeru. Prethodna istraživanja sugeriraju da povećanje omjera otapalo:uzorak (biljni materijal) nakon određene točke ne dovodi nužno do daljnjeg povećanja udjela antocijana u uzorku. Naime, iako veći udio otapala može povećati difuziju antocijana iz biljnog materijala, preveliki omjer uzorak:otapalo može dovesti do previše razrijeđenog otapala, što smanjuje učinkovitost ekstrakcije. Dakle, nakon optimalnog omjera, daljnje povećanje količine otapala može dovesti do smanjenja koncentracije antocijana u konačnom ekstraktu, čime se ne postiže daljnje poboljšanje ekstrakcije. Višak otapala, bez povoljnog povećanja sadržaja fenola i antocijana, također treba izbjegavati jer dovodi do nepotrebne upotrebe otapala i neopravdanog povećanja operativnih troškova (Wang i sur., 2018).

### 4.2.3. Utjecaj parametara MAE na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom



**Slika 13.** Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u uzorcima ekstrakta komine borovnice dobivenih primjenom MAE

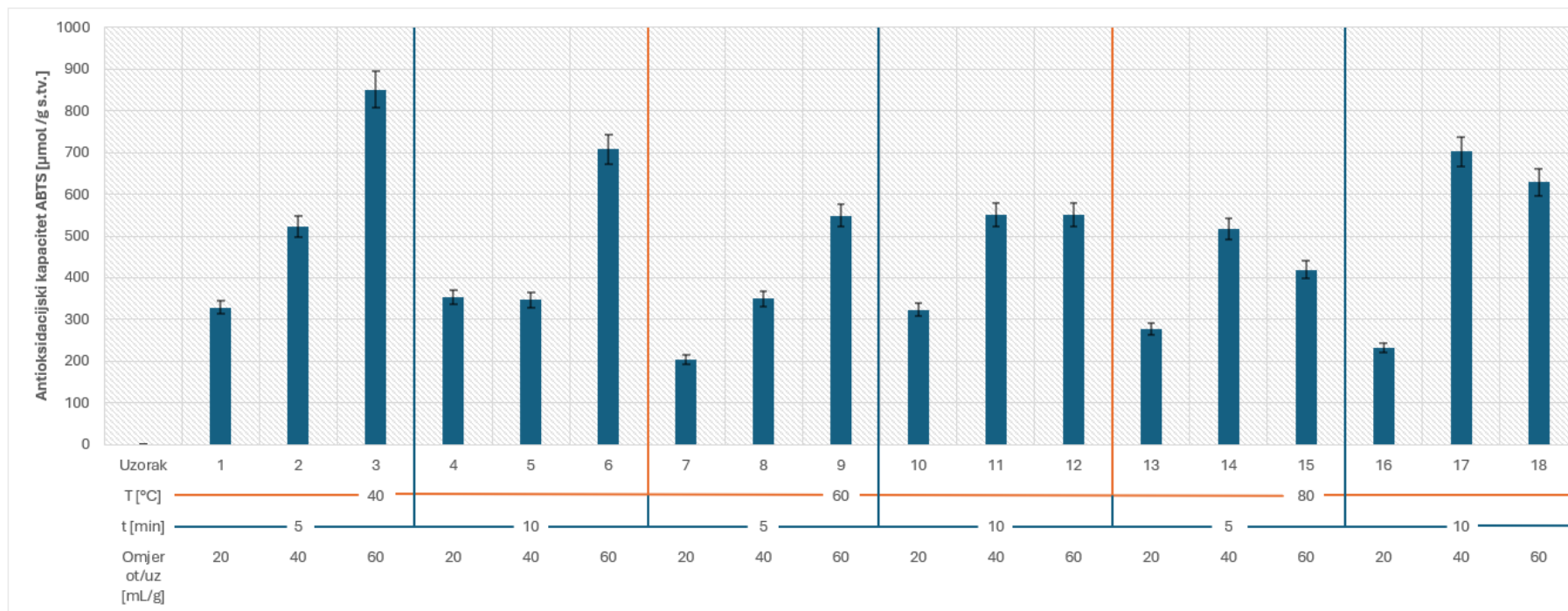


FRAP metoda (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je široko korištena tehnika za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u raznim biljnim uzorcima, uključujući i ekstrakte komine borovnice, posebno u kontekstu kvantifikacije bioaktivnih spojeva poput fenola i flavonoida.

Nakon provedenih analiza antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u ispitivanim uzorcima ekstrakta komine borovnice određen je u rasponu od 105,62  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  do 538,43  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  (slika 13) s ukupnom prosječnom vrijednošću 281,67  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  (tablica 2). Najmanji antioksidacijski kapacitet dobiven je u uzorku 6 pri 40 °C, vremenu ekstrakcije od 10 min te omjeru otapalo:uzorak 60 mL/g, dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku 9 pri 60 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapalo:uzorak 60 mL/g. Iz rezultata se može zaključiti da se antioksidacijski kapacitet statistički značajno razlikuje ( $p < 0,01$ ) ovisno o promjeni temperature, dok omjer uzorak:otapalo i vrijeme ekstrakcije nisu imali statistički značajniji utjecaj. Prilikom promjene temperature sa 40 °C (179,20 $\pm$ 23,01  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$ ) na 60 °C (329,28 $\pm$ 44,02  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$ ) dolazi do povećanog antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom u komini borovnice, dok se pri povećanju temperature sa 60 °C na 80 °C ne pokazuje značajnije povećanje antioksidacijskog kapaciteta.

U istraživanju Ferreire i sur. (2020) o optimizaciji mikrovalovima potpomognute ekstrakcije (MAE) antocijana iz komine borovnice, istraživana je utjecaj temperatura u rasponu od 8 do 100 °C. Dobiveni model predvidio je maksimalni prinos antocijana na 100 °C uz vrijeme ekstrakcije od 5 minuta. Pri tim uvjetima, antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iznosio je 365  $\mu\text{mol TE/g}$ , što je u skladu s našim rezultatima koji pokazuju veći antioksidacijski kapacitet pri višim temperaturama. Mikrovalovi ubrzavaju razgradnju staničnih struktura i olakšavaju oslobađanje bioaktivnih spojeva, uključujući antioksidanse poput fenola i antocijana. Povišenje temperature povećava topljivost ovih spojeva u otapalu i ubrzava njihov prijenos iz biljnog materijala u otapalo, čime se povećava antioksidacijski kapacitet ekstrakta. Antioksidansi poput antocijana i drugih fenolnih spojeva su osjetljivi na visoke temperature. Nakon što temperatura prijeđe optimalnu granicu, dolazi do njihove razgradnje ili transformacije u manje aktivne spojeve te posljedično dolazi stagniranja ili smanjenja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta.

#### 4.2.4. Utjecaj parametara MAE na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom



**Slika 14.** Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u uzorcima ekstrakta komine borovnice dobivenih primjenom MAE

ABTS metoda (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) je pouzdana i široko korištena za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta, osobito u istraživanjima ekstrakata bogatih polifenolima, uključujući flavonoide i antocijane, poput komine borovnice.

Nakon provedenih analiza antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u ispitivanim uzorcima ekstrakta komine borovnice određen u rasponu od 203,72  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  do 851,39  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  (slika 14) s ukupnom prosječnom vrijednošću 467,53  $\mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$  (tablica 2). Najmanji antioksidacijski kapacitet dobiven je u uzorku 7 pri 60 °C, vremenu ekstrakcije od 5 min te omjeru otapalo:uzorak 20 mL/g, dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku 3 pri 40 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapalo:uzorak 60 mL/g. Iz rezultata se može zaključiti da se antioksidacijski kapacitet statistički značajno razlikuje ( $p < 0,01$ ) ovisno o omjeru uzorak:otapalo, dok vrijeme ekstrakcije i primijenjena temperatura nisu imali statistički značajniji utjecaj. Prilikom povećanja udjela otapala sa 20 mL/g ( $286,62 \pm 16,78 \mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$ ) na 30 mL/g ( $498,02 \pm 37,73 \mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$ ) te na 40 mL/g ( $617,95 \pm 41,91 \mu\text{mol TE/g s.tv. komine}$ ) dolazi do povećanog antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom u komini borovnice.

Capaldi i sur. (2024) proveli su eksperimentalno istraživanje o antioksidativnoj aktivnosti komine borovnice određenom ABTS metodom i dobili vrijednost od 1633  $\mu\text{mol TE/g ekstrakta}$ . Razlog za dobivene više vrijednosti u navedenom istraživanju može se pretpostaviti u korištenju drugog tipa otapala i primjeni viših temperatura u usporedbi s našim istraživanjem, a što bi moglo značajno utjecati na učinkovitost ekstrakcije ciljnih spojeva. Isti rad navodi i da se povećanjem omjera uzorak:otapalo (npr. s 1:10 na 1:30 mL/g) povećava antioksidacijski kapacitet, što je u skladu s našim istraživanjem. U istraživanju Jara-Palacios i sur. (2019) izmjerena antioksidativna aktivnost određena ABTS metodom u komini borovnice iznosila je  $269.8 \pm 3.5 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$  što je niže od naše dobivene vrijednosti. Razlog tomu može biti druga metoda i uvjeti ekstrakcije te korištenje različitog otapala.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima učinkovita je tehnika izolacije fenola i antocijana iz komine borovnice kojom je dobivena prosječna koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu komine borovnice 50,99 mg GAE/g s.tv., te prosječna koncentracija antocijana 5,12 mg CYN-3-GLU/g s.tv.
2. Očekivano zbog visokog udjela fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet određen primjenom obiju metoda bio je visok te je prosječni antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iznosio 281,67  $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ , a ABTS metodom iznosio je 467,53  $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$
3. Najbolji omjer uzorka i otapala za ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana bio je 1:40, pri čemu su postignute vrijednosti od  $54,10 \pm 4,43$  mg GAE/g s.tv. za fenole i  $5,29 \pm 0,12$  mg CYN-3-GLU/g s.tv. za antocijane. Za antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom, najbolji rezultat zabilježen je pri omjeru 1:60, s vrijednošću od  $617,95 \pm 41,91$   $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ , dok omjer uzorka i otapala nije značajnije utjecao na rezultate FRAP metode ( $p=0,26$ ). Zaključujemo da kod omjera uzorka i otapala 1:40 proces ekstrakcije dostiže dinamičku ravnotežu, pri čemu je većina dostupnih fenola ekstrahirana, a daljnje povećanje volumena otapala ne rezultira značajnim porastom koncentracije ekstrahiranih spojeva, što ukazuje na zasićenje sustava.
4. Najbolja temperatura za ekstrakciju ukupnih fenola je 80 °C, pri čemu je postignuta koncentracija od  $42,47 \pm 1,96$  mg GAE/g s.tv. Za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, najbolji rezultat zabilježen je pri 60 °C, s vrijednošću od  $329,28 \pm 44,02$   $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ . Temperatura nije značajno utjecala na ekstrakciju antocijana niti na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom. Na temelju rezultata zaključujemo da je optimalna temperatura za ekstrakciju ukupnih fenola i ostalih bioaktivnih spojeva 80 °C, jer omogućava učinkovitu ekstrakciju uz minimiziranje rizika degradacije.
5. Vrijeme trajanja ekstrakcije od 5 min pokazalo se dovoljno efikasnim za većinu analiziranih parametara, uključujući ukupne fenole, antocijane i antioksidacijski kapacitet, čime se proces ekstrakcije može skratiti bez gubitka kvalitete ekstrakta.
6. Optimalni uvjeti pri kojima su postignute najveće vrijednosti udjela fenola, antocijana i antioksidacijskog kapaciteta su pri omjeru uzorak:otapalo 1:40 g/mL, temperaturi 80 °C i vremenu ekstrakcije 5 min.

## 6. LITERATURA

Åkeström A, Jaakola L, Bång U, Jäderlund A (2010) Effects of latitude-related factors and geographical origin on anthocyanidin concentration in fruits of *Vaccinium myrtillus* L. (bilberries). *J Agric Food Chem*, **58**, 11939–11945. <https://doi.org/10.1021/jf102407n>

Aliaño-González MJ, Jarillo JA, Carrera C, Ferreiro-González M, Álvarez JÁ, Palma M, i sur. (2020) Optimization of a novel method based on ultrasound-assisted extraction for the quantification of anthocyanins and total phenolic compounds in blueberry samples (*Vaccinium corymbosum* L.). *Foods*, **9**, 1763. <https://doi.org/10.3390/foods9121763>

Bamba BSB, Shi J, Tranchant CC, Xue SJ, Forney CF, Lim LT (2018) Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*, **23**(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071685>

Benzie IF i 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>

Blejan AM, Nour V, Păcularu-Burada B, Popescu SM (2023) Wild bilberry, blackcurrant, and blackberry by-products as a source of nutritional and bioactive compounds. *Int J Food Prop*, **26**(1), 1579–1595. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2224530>

Brouillard R (1982) Chemical structure of anthocyanins. In: P. Markakis, ed. *Anthocyanins as food colors*. 1–40. [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=SN8XbvA1w8gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Brouillard,+R.,+1982.+Chemical+structure+of+anthocyanins.+In:+Markakis,+P.+\(Ed.\),+Anthocyanins+as+Food+Colors,+pp.+1-40.](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=SN8XbvA1w8gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Brouillard,+R.,+1982.+Chemical+structure+of+anthocyanins.+In:+Markakis,+P.+(Ed.),+Anthocyanins+as+Food+Colors,+pp.+1-40.) [Pristupljeno 10. listopada 2024]

Capaldi G, Aimone C, Calcio Gaudino E, Radošević K, Bagović M, Grillo G, Cravotto G (2024) The Green Extraction of Blueberry By-Products: An Evaluation of the Bioactive Potential of the Anthocyanin/Polyphenol Fraction. *Int J Mol Sci*, **25**(20), 11032. <https://doi.org/10.3390/ijms252011032>

Castaneda-Ovando A, Pacheco-Hernandez ML, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*, **113**(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

Cavalloro V, Martino E, Linciano P, Collina S (2021) Microwave-assisted solid extraction from natural matrices. In: Churyumov, G., ed. *Microwave heating - electromagnetic fields causing thermal and non-thermal effects*. London: IntechOpen, 35–56.

Cheynier V (2012) Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem Rev*, **11**, 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>

Chupin L, Maunu SL, Reynaud S, Pizzi A, Charrier B, Charrier-El Bouhtoury F (2015) Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization, *Ind Crops Prod*, **65**, 142. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.052>

Ćujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S (2016) Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem*, **194**, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>

Dabbou S, Ferrocino I, Kovitvadhi A, Dabbou S, Bergagna S, Dezzuto D i sur. (2019) 'Bilberry pomace in rabbit nutrition: effects on growth performance, apparent digestibility, caecal traits, bacterial community and antioxidant status', *animal*, 13(1), 53–63. doi:10.1017/S175173111800099X.

DDW Color (2024) *Zašto antocijani mijenjaju boju?* <https://learn.ddwcolor.com/why-do-anthocyanins-change-color/> [Pristupljeno 28. listopada 2024.]

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7), 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>

Duan Y, Tarafdar A, Chaurasia D, Singh A, Bhargava PC, Yang J i sur. (2022) Blueberry fruit valorization and valuable constituents: A review. *Int J Food Microbiol*, 381, 109890. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109890>

Ebert G (2008) Uzgoj borovnica i brusnica. *Gaudeamus Požega, ISNB*, 978-953.

FAO (2019) *The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture*. FAO: Rome, Italy. <http://www.fao.org/3/CA3129EN/ca3129en.pdf>

Feng L, Zhou Y, Ashaolu TJ, Ye F, Zhao G (2019) Physicochemical and rheological characterization of pectin-rich fraction from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Int J Biol Macromol*, 128, 629-637. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.166>

Ferreira LF, Minuzzi NM, Rodrigues RF, Pauletto R, Rodrigues E, Emanuelli T (2020) Citric acid water-based solution for blueberry bagasse anthocyanins recovery: Optimization and comparisons with microwave-assisted extraction (MAE). *LWT - Food Science and Technology*, 133, 110064. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110064>

Ganzler K, Szinai I, Salgó A (1990) Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique, *J Chromatogr*, 520, 257. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(90\)85109-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(90)85109-9)

Gavrilova V, Kajžanoska M, Gjamovski V, Stefova M (2011) Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J Agric Food Chem*, 59(8), 4009-4018. <https://doi.org/10.1021/jf104565y>

Gedye FSR, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Rousell JL (1986) The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Lett*, 27, 279. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)83996-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)83996-9)

Giacalone M, Di Sacco F, Traupe I, Topini R, Forfori F, Giunta F (2011) Antioxidant and neuroprotective properties of blueberry polyphenols: a critical review. *Nutr Neurosci*, 14(3), 119–125. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000007>

Giguere RJ, Duncan SM (1986) Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett*, 27, 4945. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85103-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85103-5)

Greensky Bio (2024) The art of extraction: A comprehensive guide to maceration, Soxhlet, ultrasonic, and supercritical fluid methods. *Greensky Bio*. [https://www.greenskybio.com/plant\\_extract/the-art-of-extraction-a-comprehensive-guide-to-maceration-soxhlet-ultrasonic-and-supercritical-fluid-methods.html](https://www.greenskybio.com/plant_extract/the-art-of-extraction-a-comprehensive-guide-to-maceration-soxhlet-ultrasonic-and-supercritical-fluid-methods.html) (Pristupljeno: 28. lipnja 2024.)

Gündeşli MA, Korkmaz N, Okatan V (2019) Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: A review. *Int J Agric For Life Sci*, **3**(2), 350–361.

Han X, Shen T, Lou H (2007) Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci*, **8**(9), 950–988. <https://doi.org/10.3390/i8090950>

Hellström J, Karhu S, Karhu J, Järvenpää E, Välimaa A-L (2024) Phenolic profiles differentiate wild bilberry and cultivated blueberry fruit. *LWT*, **199**, 116080. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116080>

Herrera-Balandrano DD, Chai Z, Beta T, Feng J, Huang W (2021) Blueberry anthocyanins: An updated review on approaches to enhancing their bioavailability. *Int J Mol Sci*, **118**, 808–821. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.006>

Hou L, Lan W, Chen D, Wang L (2024) Effects of four drying methods on the quality, antioxidant activity, and anthocyanin components of blueberry pomace. *Food Production, Process Nutr*, **4**(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00051-y>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric*, **83**(12), 1238–1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA (1987) Anthocyanins as food colorants: properties, applications and stability. *J Food Biochem*, **11**(5), 267–280. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x>

Jara-Palacios MJ, Santisteban A, Gordillo B, Hernanz D (2019) Comparative study of red berry pomaces (blueberry, red raspberry, red currant, and blackberry) as sources of antioxidants and pigments. *J Food Biochem*, **245**, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3135-z>

Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC (1999) The effects of blueberry supplementation on cognitive function and brain aging. *J Neurosci*, **19**(18), 8114–8121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-08114.1999>

Kalt W, Ryan DAJ, Duy JC, Prior RL, Ehlenfeldt MK, Kloet SP (2001) Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium section Cyanococcus* spp.). *J Agric Food Chem*, **49**(10), 4761–4767. <https://doi.org/10.1021/jf010653e>

Katalinić V (2011) *Temeljno znanje o prehrani*. Sveučilišni priručnik / Katalinić, V. (ur.). Split: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 154

Kellog J, Wang J, Flint C, Ribnicky D, Kuhn P, González de Mejía E, Raskin I, Lila AM (2010) Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *J Agric Food Chem*, **58**, 3884–3900. <https://doi.org/10.1021/jf902693r>

Khanal RC, Howard LR, Brownmiller CR, Prior RL (2009) Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *J Food Sci*, **74**(1), 52–58. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01063.x>

Koh J, Xu Z, Wicker L (2020) Blueberry pectin and increased anthocyanins stability under in vitro digestion. *Food Chem* **302**, 125343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125343>

- Koubaa M, Roselló-Soto E, Šic Žlabur J, Režek Jambrak A, Brnčić M, Grimi N, Boussetta N, Barba FJ (2015) Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from *Stevia rebaudiana Bertoni*. *J Agric Food Chem*, **63**(31), 6835–6846. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01994>
- Krifi B, Metche M (2001) Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *J Food Sci*, **35**(3), 275–283. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00330.x>
- Kuang L, Wang Z, Zhang J, Li H, Xu G, Li J (2022) Factor analysis and cluster analysis of mineral elements contents in different blueberry cultivars. *J Food Compos Anal*, **109**, 104507. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104507>
- Kuntz S, Kunz C, Rudloff S (2017) Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice. *Eur J Nutr*, **56**(1), 203–214. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1070-3>
- Lao F, Giusti MM (2018) Extraction of Purple Corn (*Zea Mays L.*) Cob Pigments and Phenolic Compounds Using Food-Friendly Solvents. *J Cereal Sci*, **80**, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.001>
- Li Y, Fabiano-Tixier AS, Tomao V, Cravotto G, Chemat F (2013) Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrason Sonochem*, **20**(1), 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.005>
- Lovrić V, Putnik P, Kovačević DB, Jukić M, Dragović-Uzelac V (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol Biotechnol*, **55**(2), 243–250. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4687>
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR (2004) Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J. Agric Food Chem*, **52**(20), 6178–6187. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf049450r>
- Madhavan A, Arun KB, Alex D, Anoopkumar AN, Emmanuel S, Chaturvedi P i sur. (2023) Microbial production of nutraceuticals: Metabolic engineering interventions in phenolic compounds, polyunsaturated fatty acids, and carotenoids synthesis. *J Food Sci Technol*, **60**(8), 2092–2104. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05482-5>
- 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>
- Martz F, Jaakola L, Julkunen-Tiitto R, Stark S (2010) Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in northern Europe following foliar development and along environmental gradients. *J Chem Ecol*, **36**, 1017–1028. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9836-9>
- Mazza G, Brouillard R (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem*, **25**, 207–225. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90147-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90147-6)
- Milbury PE, Kalt W (2010) Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood–brain barrier. *J Agric Food Chem*, **58**(7), 3950–3956. <https://doi.org/10.1021/jf903529m>



Miljković I (2006) Borovnica - uzgoj (*Vaccinium corymbosum* L.). *Gospodarski list*, 18. Pristupljeno 5. srpnja 2024.

Može Š, Polak T, Gašperlin L, Koron D, Vanzo A, Ulrih NP i sur. (2011) Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J Agric Food Chem*, **59**, 6998–7004. <https://doi.org/10.1021/jf200765n>

Mratinić E (2015). Borovnica i brusnica. *Partenon, Beograd*.

Ortiz A, Lidia D, Jaramillo G, Cardenas E (2004) Nutritional and functional properties of Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) seeds: A review. *Plant Foods Hum Nutr*, **59**(1), 11–16. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0032-3>

Padmanabhan P, Correa-Betanzo J, Paliyath G (2016) Berries and related fruits. In: Caballero B, Finglas P, Toldra F, eds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 1st ed. London: Academic Press, 364-371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00060-X>

Pavlović N (2020) *Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz kakaove ljuske* (disertacija). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:537373>

Pellegrini N, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F i sur. (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>

Pico J, Yan Y, Gerbrandt E, Castellarin S (2022) Determination of free and bound phenolics in northern high bush blueberries by a validated HPLC/QTOF methodology. *J Food Compos Anal*, **108**, 104412. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104412>

Pongmalai P, Devahastin S, Chiewchan N, Soponronnarit S (2015) Enhanced recovery of bioactive compounds from food and agricultural wastes using hybrid drying technologies. *Sep Purif Technol*, **144**, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.02.010>

Praveen MA, Parvathy KRK, Balasubramanian P, Jayabalan R (2019) An overview of extraction and purification techniques of seaweed dietary fibers for immunomodulation on gut microbiota. *Trends Food Sci Technol*, **92**, 46–64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.011>

Puente L, Pinto-Muñoz C, Castro E, Cortés M (2011) *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. *Food Res Int*, **44**, 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>

Rashidinejad A (2020) Blueberries. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, 467–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00029-5>

Rezaei S, Rezaei K, Haghghi M, Labbafi M (2013) Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food Sci Biotechnol*, **22**(5), 1269–1274. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0212-8>.

Rodriguez-Mateos A, Cifuentes-Gomez T, Tabatabaee S, Lecras C, Spencer JPE (2012) Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic acid contents of highbush and lowbush blueberries. *Food Sci Biotechnol*, **60**(23), 5772-5778. <https://doi.org/10.1021/jf203812w>

- Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Bergillos-Meca T, Tabatabaee S, George TW, Heiss C, Spencer JPE (2013) Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am J Clin Nutr*, **98**(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.066639>
- Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ (2012) Supercritical antisolvent precipitation of quercetin nanoparticles. *J Food Eng*, **109**, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>
- Rossi G, Woods FM, Leisner CP (2022) Quantification of total phenolic, anthocyanin, and flavonoid content in a diverse panel of blueberry cultivars and ecotypes. *HortScience*, **57**(8), 965–975. (Preuzeto 15. listopada 2024.) <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16647-22>
- Routray W, Orsat V (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioproc Technol*, **5**, 409–424. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>
- Saleh IA, Vinatoru M, Mason TJ, Abdel-Azim NS, Aboutabl EA, Hammouda FM (2016) A possible general mechanism for ultrasound-assisted extraction (UAE) suggested from the results of UAE of chlorogenic acid from *Cynara scolymus* L. (artichoke) leaves. *Ultrason Sonochem*, **31**, 330. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.002>
- Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods*, **18**, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science*, **98**, 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Stull AJ, Cash KC, Johnson WD, Champagne CM, Cefalu WT (2010) Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *J Nutr*, **140**(10), 1764–1768. <https://doi.org/10.3945/jn.110.125336>
- Su MS, Silva JL (2006) Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chem*, **97**(3), 447–451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.023>
- Šarić B, Mišan A, Mandić A, Nedeljković N, Pojić M, Pestorić M i sur. (2016) Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. *J Food Sci Technol*, **53**, 1140–1150. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2128-1>
- Troncoso Mesa S, Flórez-Méndez J, Lopez J, Rubén B (2021) Optimization of conventional solid-liquid extraction and microwave-assisted extraction of polyphenols and antioxidant compounds of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) pomace through response surface methodology. *J Berry Res*, **11**(4), 649–668. DOI: 10.3233/JBR-210007.
- Uleberg E, Rohloff J, Jaakola L, Tröst K, Junttila O, Häggman H i sur. (2012) Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of Northern and Southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *J Agric Food Chem*, **60**(41), 10406-10414. <https://doi.org/10.1021/jf302924m>

- USDA (2022) National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release, <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/2346411/nutrients> Pristupljeno 6. studenog 2024.
- Veberić R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M (2015) Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, **60**(1), 509-517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.033>
- Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA (2012) Fundamentals of microwave extraction. In: Chemat F, Cravotto, G., eds. *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds*. Boston, MA: Springer. (Food Engineering Series), 15–52. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_2)
- Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **97**, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Vulić JJ, Tumbas VT, Savatović SM, Đilas SM, Četković GS, Čanadanović-Brunet JM (2011) Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta Period Technol*, **42**, 271–279. <https://doi.org/10.2298/APT1142271V>
- Wang L, Lan W, Chen D (2024) Blueberry (*Vaccinium* spp.) anthocyanins and their functions, stability, bioavailability, and applications. *Foods*, **13**(17), 2851. <https://doi.org/10.3390/foods13172851>.
- Wang T, Guo N, Wang SX, Kou P, Zhao CJ, Fu YJ (2018) Ultrasound-negative pressure cavitation extraction of phenolic compounds from blueberry leaves and evaluation of its DPPH radical scavenging activity. *Food Bioprod Process*, **108**, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.01.003>
- Wen Y, Chen H, Zhou X, Deng Q, Zhao Y, Zhao C i sur. (2015) Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, **5**(25), 19686–19695. <https://doi.org/10.1039/C4RA16396F>
- Yang Y-C, Li J, Zu Y-G, Fu Y-J, Luo M, Wu N i sur. (2010) Optimisation of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of their antioxidant activity. *Food Chem*, **122**, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.061>
- Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*, **51**(6), 675–683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>
- Zhao C-N, Zhang J-J, Li Y, Meng X, Li H-B (2018) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: Optimization and identification. *Molecules*, **23**(10), 2498. <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/10/2498>
- Zhao M, Wang P, Zhu Y, Liu X, Hu X, Chen F (2015) Blueberry anthocyanins extract inhibits acrylamide-induced diverse toxicity in mice by preventing oxidative stress and cytochrome P450 2E1 activation. *J Funct Food*, **14**, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.035>
- Zhou L, Lie Y, Briers H, Fan J, Remón J, Nyström J i sur. (2018) Natural product recovery from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) presscake via microwave hydrolysis. *ACS Sustainable Chem Eng* **6**(3), 3676–3685. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03999>

- Zoratt L, Klemettilä H, Jaakola, L (2016) Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) ecotypes. In: Simmonds, M. & Preedy, V.R., eds. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. 1st ed. London: Academic Press, 83-99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00004-0>
- Zoratti L, Jaakola L, Häggman H, Giongo L (2015) Anthocyanin profile in berries of wild and cultivated *Vaccinium* spp. along altitudinal gradients in Alps. *J Agric Food Chem*, 63(38), 8641-8650. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02833>
- Zorenc Z, Veberic R, Stampar F, Koron D, Mikulic-Petkovsek M (2016) Changes in berry quality of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during the harvest season. *Turk J Agric For*, 40(6), 855–864. <https://doi.org/10.3906/tar-1607-57>
- Zou H, Ye H, Zhang J, Ren L (2022) Recent advances in nuclear receptors-mediated health benefits of blueberry. *Phytomedicine*, 100, 154063. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154063>
- Zuloaga O, Etxebarria N, Fernández LA, Madariaga JM (1999) Optimisation and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*, 50, 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00028-4)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis