

Utjecaj vrste otapala na udio ukupnih fenola u ekstraktu lista smokve

Šiptar, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:777726>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Paula Šiptar

7650/PT

**UTJECAJ VRSTE OTAPALA NA UDIO UKUPNIH FENOLA U
EKSTRAKTU LISTA SMOKVE**

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: Prof.dr.sc. Branka Levaj

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj vrste otapala na udio ukupnih fenola u ekstraktu lista smokve

Paula Šiptar, 0058213233

Sažetak: Cilj rada bio je proučiti kako pojedina otapala (deionizirana voda, 40%-tni etanol, 96%-tni etanol) utječu na mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva (mjenjenih Folin-Ciocalteu metodom) listova smokve (9 sorti) te peteljke lista. Analizirani su listovi Miljske fige, Zimice, Panache, Fico della Madonne, Petrovače bijele, Sušioke, Bjelice, Petrovače crne, Šaraguje te peteljka lista nepoznate sorte. Najniži udjeli ukupnih fenola dobiveni su korištenjem 96%-tnog etanola. Udjeli ukupnih fenola u deioniziranoj vodi i 40%-tnom etanolu nisu bili bitno različiti. Izmjeren udio ukupnih fenola u ekstraktima peteljke znatno je manji nego u bilo kojem ekstraktu lista. Najmanji udio ukupnih fenola izmjeren je u lišću sorata Sušioka i Bjelica u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu, odnosno u sortama Sušioka i Petrovača crna u 96%-tnom etanolnom ekstraktu. Neovisno o vrsti otapala, najveći udio ukupnih fenola izmjeren je u sortama Zimica i Fico della Madonna.

Ključne riječi: fenolni spojevi, list smokve, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 26 stranica, 9 slika, 1 tablicu, 30 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Prof. dr. sc. Branka Levaj*

Pomoć pri izradi: *Ana Dobrinčić, mag. ing. techn. aliment.*

Datum obrane: 1. rujan 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Solvents impact on total phenolic content of fig leaf extract

Paula Šiptar, 0058213233

Abstract: The aim of this study was to research influence of the solvents (deionized water, 40% ethanol and 96% ethanol) in the microwave assisted extraction on total phenolics (TP, by the Folin-Ciocalteu method) from the fig leaves (9 cultivars) and the leaf-stem. The leaves of Miljska figa, Zimica, Panache, Fico della Madonna, Petrovača bijela, Sušioka, Bjelica, Petrovača crna, Šaraguja and the leaf-stem of an unknown cultivar were analyzed. The lowest TP were obtained by 96% ethanol. TP in deionized water and 40% ethanol extracts was not noticeably different. In the leaf-stem extracts TP was much lower than in any leaf-extract. The lowest TP was measured in the aqueous and 40% ethanolic extract of the cultivars Sušioka and Bjelica, as well as in the 96% ethanolic extract of the cultivars Sušioka i Petrovača crna. Disregarding the solvent, the highest TP was measured in the cultivars Zimica and Fico della Madonna.

Keywords: fig leaf, microwave-assisted extraction, phenolic compounds

Thesis contains: 26 pages, 9 figures, 1 table, 30 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Branka Levaj, Full Professor*

Technical support and assistance: *Ana Dobrinčić, mag. ing. techn. aliment.*

Defence date: September 1st 2021



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



Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SMOKVA (<i>FICUS CARICA L.</i>).....	2
2.1.1. <i>Kemijski sastav lista smokve.....</i>	<i>3</i>
2.2. FENOLNI SPOJEVI	4
2.2.1. <i>Fenolne kiseline.....</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Flavonoidi</i>	<i>6</i>
2.2.3. <i>Kumarini.....</i>	<i>7</i>
2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	7
2.3.1. <i>Izbor otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva</i>	<i>9</i>
2.3.2. <i>Mikrovalna ekstrakcija.....</i>	<i>10</i>
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. <i>Uzorci lista i peteljke smokve.....</i>	<i>13</i>
3.1.2. <i>Kemikalije.....</i>	<i>13</i>
3.1.3. <i>Otopine</i>	<i>14</i>
3.1.4. <i>Instrumenti i pribor</i>	<i>14</i>
3.2. METODA RADA.....	15
3.2.1. <i>Mikrovalna ekstrakcija.....</i>	<i>15</i>
3.2.2. <i>Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola</i>	<i>15</i>
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČAK.....	23
6. POPIS LITERATURE:	24

1. UVOD

Smokva (*Ficus carica*) je jedna od prvih kultiviranih biljaka, a raste u područjima tropske i suptropske klime. Bogat je izvor nutritivnih i biološko aktivnih tvari. Pripisuju joj se mnoga ljekovita djelovanja te se gotovo svi njeni dijelovi (plod, list, korijen) od davnina koriste u tradicionalnoj medicini. Upravo zbog svog bogatog i raznolikog sadržaja fitokemikalija, *Ficus carica*, sve više je predmet raznih istraživanja koja su usmjerena prema izolaciji i zdravstvenom učinku biološki aktivnih tvari.

Mnoga istraživanja usmjerena su upravo na izolaciju fitokemikalija, odnosno fenolnih spojeva lista smokve. List smokve bogat je biološki aktivnim spojevima, posebice fenolnim spojevima, točnije hidroksibenzojevim kiselinama, hidroksicimetnim kiselinama, flavonoidima, kumarinima i furanokumarinima. Interes za izolaciju i proučavanje fenolnih spojeva sve više raste iz razloga što mnogi fenolni spojevi mogu djelovati kao antioksidansi te na taj način odgoditi ili spriječiti oksidaciju te smanjiti oksidacijski stres koji doprinosi razvoju raznih kroničnih degenerativnih bolesti kao i u razvoju kardiovaskularnih bolesti i starenja.

Postoje razne metode ekstrakcije fenolnih spojeva, od konvencionalnih (klasičnih) do raznih nekonvencionalnih (suvremenih) metoda. Zbog mnogih prednosti, nekonvencionalne metode sve više zamjenjuju konvencionalne. Jedna od nekonvencionalnih (suvremenih) metoda je mikrovalna ekstrakcija koja se temelji na korištenju energije mikrovalova što olakšava prijenos biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala u odabrano, prikladno otapalo. Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pokazala se kao brza, efikasna, ekonomična te ekološki prihvatljivija metoda ekstrakcije.

Cilj ovog rada bio je istražiti kako različita, polarna otapala (deionizirana voda, 40%-tni etanol, 96%-tni etanol) utječu na mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista različitih sorata smokve kao i iz peteljke, odnosno na udio ukupnih fenolnih spojeva u dobivenim ekstraktima.

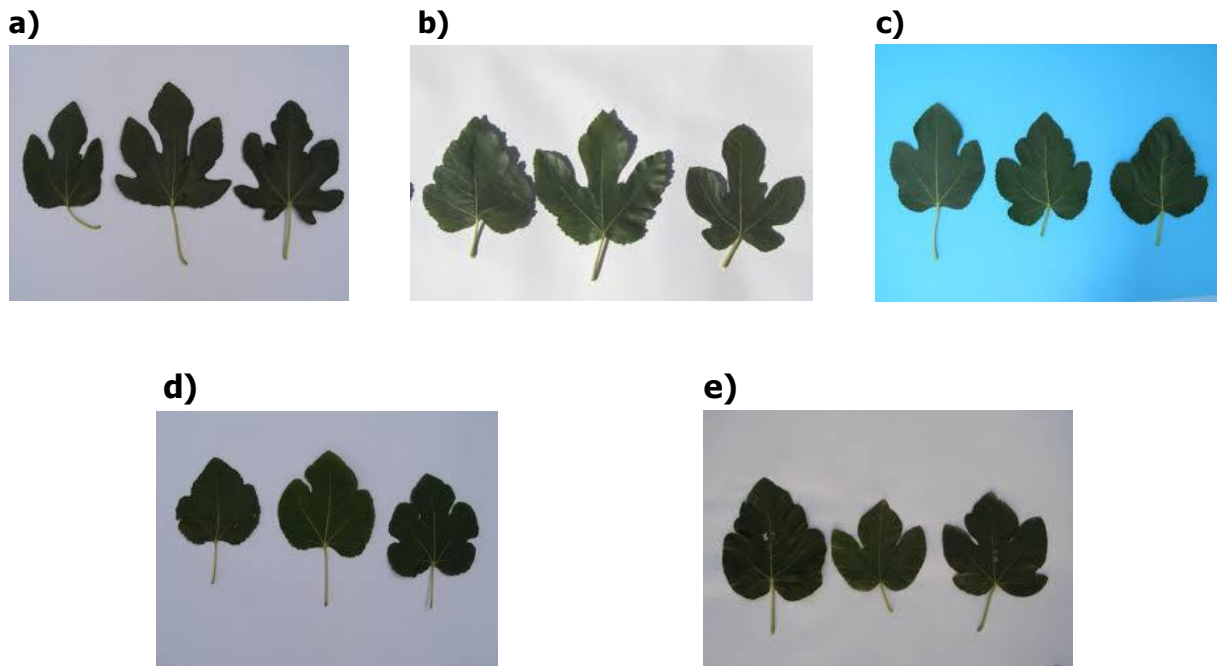
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Smokva (*Ficus carica* L.)

Smokva se smatra jednom od prvih kultiviranih biljnih vrsta, a pretpostavlja se da je podrijetlom iz Perzije i Sirije (Prgomet i Prgomet, 2020). Raste u područjima tropske i suptropske klime, a poznato je više od 1400 vrsta (Mawa i sur., 2013).

Smokva pripada porodici dudova (*Moraceae*) te rodu *Ficus*. Obična smokva ili *Ficus carica* L. ima dvije podvrste: *Ficus carica* ssp. *sativa* i *Ficus carica* ssp. *caprificus*. *Ficus carica* ssp. *sativa* je smokva jestivih plodova (pitoma smokva), dok je *Ficus carica* ssp. *caprificus* vrlo važna za oprašivanje i rodnost pitome smokve, no nema jestive plodove (divlja smokva) (Prgomet i Prgomet, 2020).

Smokva (*Ficus carica* L.) je listopadna biljka koja raste u obliku grmlja ili malog stabla, korijen joj je vrlo razgranat i snažan, a kora stabla je pepeljasta te kod starijih biljka i lagano raspucana (Prgomet i Prgomet, 2020; Mawa i sur., 2013). Cvat smokve gotovo je potpuno zatvoren, stoga se oprašivanje smokve ne može obaviti vjetrom niti tipičnim kukcima (npr. pčelama) nego ulogu posrednika u oprašivanju ima jedna vrsta insekta - osica *Blastophaga grossorum* L.. Botanički gledano plod smokve je sićušni oraščić sa sjemenkom koji se nalazi u unutrašnjosti cvati. Međutim, kada se govori o plodu smokve najčešće se misli na tehnološki plod, odnosno na zreli cvat, jestivu tvorevinu (Prgomet i Prgomet, 2020). Plod smokve, može se konzumirati svjež ili osušen te je izvor vitamina, minerala, ugljikohidrata, organskih kiselina, šećera, fenolnih kiselina, aminokiselina, vlakana te sadrži niski udio masti. Smokve su izvrstan izvor fenolnih spojeva, a to potvrđuje i činjenica da sadrže više fenola od čaja i crnog vina (Mawa i sur., 2013). Smokva ima velike, hrapave, tamnozeleno listove, a plojka lista je razdijeljena u lapove. Rijetko koja sorta ima cjelovitu plojku, obično su trodijelne, peterodijelne, a ponekad i sedmodijelne. Kod smokvi se može primijetiti da se na istoj biljci nalaze po veličini i obliku različiti listovi, takva pojava naziva se heterofilija (Prgomet i Prgomet, 2020). Izgled listova smokve, nekoliko različitih sorti analiziranih u ovom radu, prikazane su na slikama (slika 1.).



Slika 1. Fotografije listova smokve različitih sorata: Fico della Madonna (a); Petrovača bijela (b); Bjelica (c); Petrovača crna (d); Šaraguja (e) (Hrvatsko biološko društvo, 2021)

Korijen, plod i list smokve korišteni su u tradicionalnoj medicini prilikom liječenja raznih stanja, poput gastrointestinalnih i respiratornih problema, raznih upala te kardiovaskularnih poremećaja (Mawa i sur., 2013). *Ficus carica* L. je bogat izvor nutritivnih i biološki aktivnih tvari te joj se pripisuju mnoga ljekovita djelovanja: antioksidacijsko, anti-HSV, protufungalno, hemostatsko, hepatoprotektivno, hipoglikemijsko, antidijabetičko, antihiperlipidemijsko te uloga u imunološkom odgovoru (Nadeem i Zeb, 2018).

2.1.1. Kemijski sastav lista smokve

Smokvin list sadrži 67,6 % vode, 4,3 % proteina, 1,7 % masti, 4,7 % sirovih vlakna te 5,3 % pepela (Ahmad i sur., 2013). Fitokemikalije pronađene u listu smokve su razni hlapljivi spojevi (terpeni, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri), organske kiseline, fitosteroli, triterpenoidi, fenolni spojevi (Solana i Romano, 2020).

Pronađeni terpeni su germakren D, β -kariofilen, τ -elemen, β -elemen, β -kubeben, α -ylangen, β -bourbonen, (+)-ledene viridifloren, α -gurjunen, mentol, r -muurolen, r -kadinen, limonen, α -kubenen, kopaen, α -guaien, aromadendren, α -muurolen i α -kariofilen. Pronađeni alkoholi su 2-metil-1-butanol, 1-heptanol, 1-penten-3-ol, benzil alkohol i (E)-2-nonen-1-ol. Pronađeni aldehidi su 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, (E)-2-pental, heksanal i (E)-2-heksenal.

Pronađeni ketoni su 6-metil-5-hepten-2-on, 3-pentanon. Pronađeni esteri su metil-butanoat, heksil-acetat, etil-benzoat, metil-heksanoat i metil-salicilat. Pronađene organske kiseline su šikimska, jabučna, oksalna, fumarna, limunska i kininska. Pronađen sterol je β -sitosterol. Pronađeni triterpenoidi su metil-maslinat, oleanolna-kiselina, taraksasterol, w-taraksasterolski ester, kalotropenil-acetat, bauerenol, 24-metilencikloartanol, lupeol, lupeol-acetat i stigmasterol (Solana i Romano, 2020).

Više o pronađenim fenolnim spojevima u listu smokve te njihovom zdravstvenom aspektu nalazi se u sljedećem poglavlju ovog rada.

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi sekundarni su biljni metaboliti i ubrajaju se u specifične pigmente. Prisutni su u većini biljaka u značajnim količinama, a u samoj biljci imaju različite funkcije; sudjeluju u njenom zrenju i dozrijevanju, imaju obrambenu ulogu te djeluju antioksidacijski, antimikrobno te kao fotoreceptori (Manach i sur., 2004; Shortle i sur., 2014). Fenolnim spojevima pripada velika skupina prirodnih spojeva (poznato više od 8000 različitih struktura) koji imaju jedan ili više aromatskih prstenova na koje su povezane jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH). U prirodi se većinom nalaze esterificirani s malim organskim kiselinama, konjugirani sa glikozidnim jedinicama ili u polimernom obliku, a puno rjeđe u slobodnom obliku (Čović i sur., 2009; Shortle i sur., 2014).

S obzirom na brojnost i molekulsku raznolikost, fenolne spojeve nije lako klasificirati na temelju jednog zajedničkog svojstva (Vermerris i Nicholson, 2006). Jedna od najčešćih klasifikacija je podjela na flavonoide i neflavonoide koji imaju mnogo podskupina od raznih monomernih do polimernih oblika. U flavonoide se ubrajaju flavanoli, flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijani. Neflavonoidnim spojevima pripadaju fenolne kiseline (hidroksibenzojeve, hidroksicimetne), stilbeni, lignani, kumarini, tanini i drugi (Manach i sur., 2004; Dai i Mumper, 2010).

Sastav i udio polifenola u biljkama vrlo je promjenjiv jer na njega utječu mnogi čimbenici, poput stupnja razvoja biljke (Dragovic-Uzelac i sur., 2007) kao i izloženost vremenskim uvjetima, vrsti tla, biljnoj vrsti, varijetet, dijelu same biljke (peteljka, plod, list,..), agrotehnoški postupci, uvjeti procesiranja, uvjeti skladištenja i slično (Manach i sur., 2004).

Nadeem i Zeb (2018) određivali su koncentraciju 14 polifenolnih spojeva u listu smokve tijekom 15, 30, 45 i 60 dana sazrijevanja listova smokve te dokazali značajnu varijaciju u sastavu ukupnih fenola tijekom sazrijevanja biljke.

Mnogi fenoli na različite načine mogu djelovati kao antioksidansi; neutralizacijom reaktivnog kisika, hvatanjem slobodnih radikala, djelujući kao reducirajući agensi, donori vodika ili elektrona i slično (Solana i Romano, 2020). Na taj način mogu odgoditi ili spriječiti oksidaciju i smanjiti oksidacijski stres koji doprinosi razvoju raznih kroničnih degenerativnih bolesti kao i u razvoju kardiovaskularnih bolesti te starenja (Dai i Mumper, 2010).

U listu smokve identificirani su sljedeći fenolni spojevi: hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoidi, kumarini i furanokumarini (Li i sur., 2021).

2.2.1. Fenolne kiseline

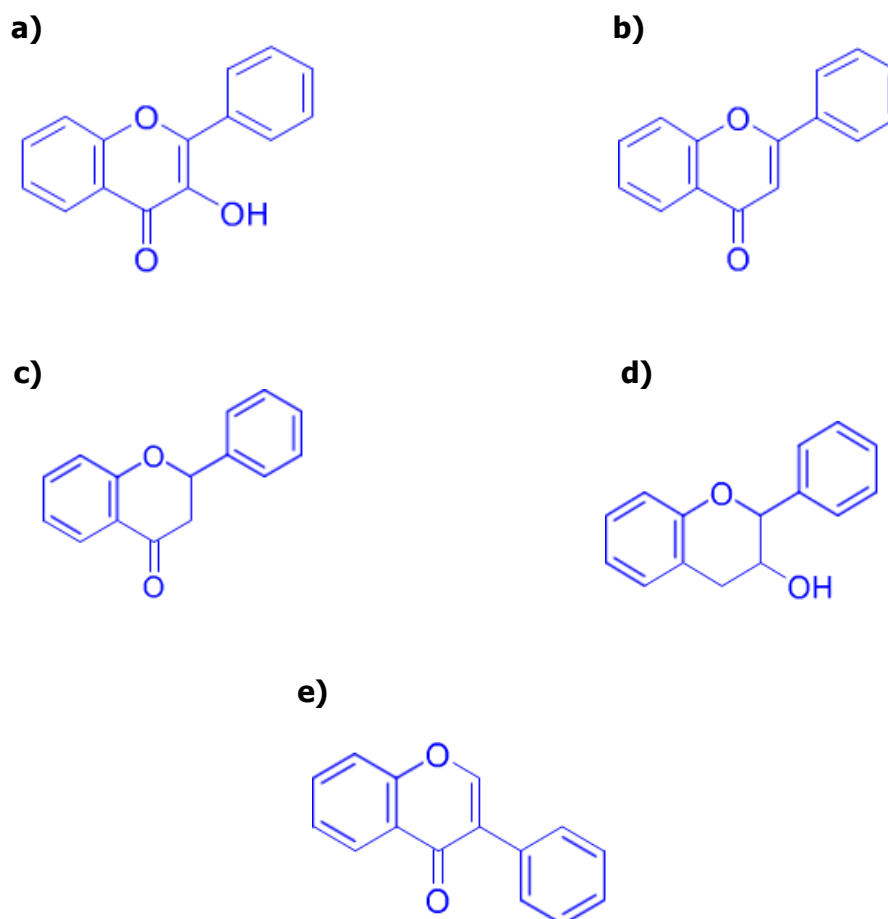
U fenolne kiseline pripadaju derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline (C_6-C_1)) i derivati cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3)) (slika 2.). Pronađeni derivati hidroksibenzojeve kiseline u listu smokve su: dipentozid galne kiseline, heksozid pentozid dihidroksibenzojeve kiseline, pentozid dihidroksibenzojeve kiseline, dipentozid dihidroksibenzojeve kiseline, heksozid siriginske kiseline, malat siriginske kiseline, heksozid dihidroksibenzojeve kiseline, glukozid vanilinske kiseline, dihidroksibenzojeva kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina. Pronađeni derivati hidroksicimetne kiseline u listu smokve su kafeoilmalna kiselina, klorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, glukozid psoralenske kiseline, malat ferulinske kiseline, ferulinska kiselina, heksozid kumaroila, heksozid sinapinske kiseline, kumaroilmalična kiselina, malat sinapinske kiseline (Li i sur., 2021).



Slika 2. Hidroksibenzojeva kiselina (a); hidroksicimetna kiselina (b) (Li i sur., 2021)

2.2.2. Flavonoidi

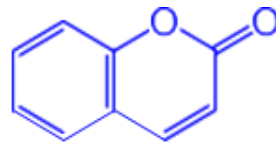
Flavonoidi su derivati aromatskih aminokiselina, tirozina i fenilalanina (Khoddami i sur., 2013). Sastoje se od dva benzenska prstena koja su povezana s heterocikličkim piranskim prstenom ($C_6-C_3-C_6$). U listu smokve pronađeni su razni derivati flavonola, flavona, flavanona, flavanola, izoflavona (slika 2.). Pronađeni flavonoli: rutin, izokvercetin, astragalin, taksifolin, galangin, miricetin, kempferol, kvercetin 3-O-malonilglukozid. Pronađeni flavoni: luteolin, viteksin, izoshaftozid, 7,4-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, 7,4,3-trihidroksiflavon, 5,3,4 trihidroksiflavon, 5,7-dihidroksiflavon, izoorientin, orientin, cinarozid, apigenin. Pronađeni flavanoni: 4-hidroksiflavanon, 2-hidroksiflavanon, 7-hidroksiflavanon, hesperetin, naringenin. Pronađen flavanol: (+)-katehin. Pronađeni izoflavoni: prenilhidroksigenistein, prenilgenistein, formononetin, hidroksi-dimetoksiizoflavon, daidzein, genistein, cajanin, biochanin A. Najviše prisutan flavonoid u lišću smokve je rutin koji ima antikancerogeno, protuupalno, antidijabetičko, antioksidacijsko, hepatoprotektivno djelovanje (Li i sur., 2021).



Slika 3. Osnovne kemijske strukture flavonoida: flavonola (a); flavona (b); flavanona (c); flavanola (d); izoflavona (e) (Li i sur., 2021)

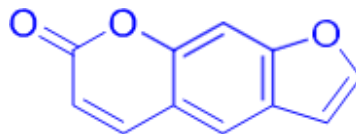
2.2.3. Kumarini

Kumarini se sastoje od benzenskog prstena kondenziranog s pironskim prstenom (slika 4.). Pronađeni kumarini u listu smokve su: murrayacarpin B, heksozid eskuletina, dihidroksikumarin, umbeliferon, felodenol A, prenil-7-hidroksikumarin. Najzastupljeniji kumarin u listu smokve je umbeliferon koji ima antibakterijako, antioksidacijsko i antidijabetičko djelovanje (Li i sur., 2021).



Slika 4. Kumarin (Li i sur., 2021)

Furanokumarini na kumarinskoj jezri imaju kondenziran furan (slika 5.). Pronađeni furanokumarini u listu smokve: psoralna kiselina, marmesin, 4', 5'- dihidropsoralen, hidroksipsoralen, izopentenoksipsoralen, heksozid hidroksipsoralena, hidrat oksipeucedanina, psoralen, metoksipsoralen, bergapten, oksipeucedanin, prenil metoskipsoralen. Najviše prisutan furanokumarin je psoralen. Iako psoralen ima pozitivna antikancerogena i antikolinesterazna svojstva, također ima i negativnu stranu jer se radi o fotosenzibilirajućoj tvari. (Li i sur., 2021).



Slika 5. Furanokumarin (Li i sur., 2021)

2.3. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese primjenom prikladnog otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese. Najčešće korištena otapala su voda, organska otapala i superkritični ugljikov dioksid. Ovisno o agregatnom stanju homogene smjese i prikladnog otapala, razlikujemo ekstrakciju: čvrsto-tekuće (izlučivanje) i tekuće-tekuće (Lovrić, 2003; Herceg, 2011).

Tijekom ekstrakcije potrebno je omogućiti miješanje krutog materijala i prikladnog otapala te određeno vrijeme zadržavanja tijekom kojeg se odvija proces prijenos mase topljive tvari u

otapalo. Nakon otapanja, otapalo s otopljenim tvarima odvaja se od krutog materijala (Herceg, 2011). Potrebno vrijeme zadržavanja, odnosno trajanje ekstrakcije ovisi o:

- topljivosti tvari u odabranom otapalu
- temperaturi ekstrakcije
- površini krute tvari koja je izložena otapalu
- viskoznosti otapala
- protoku otapala
- unutarnjoj difuziji (kod materijala sa staničnom strukturom) (Herceg, 2011).

Što je veća topljivost tvari u odabranom otapalu, to će trajanje ekstrakcije biti kraće. Povećanjem temperature ekstrakcije, povećava se i brzina otapanja. Zbog moguće ekstrakcije nepoželjnih sastojaka pri višim temperaturama, osjetljivosti materijala koji se ekstrahira i ekonomskih razloga, većina ekstrakcija provodi se na temperaturi nižoj od 100 °C. Prije same ekstrakcije poželjno je usitniti kruti materijal zato što povećanjem dodirne površine krutog materijala i otapala prijenos mase je brži, odnosno ekstrakcija kraće traje. Kako bi otapalo lakše prodiralo u kruti materijal, viskoznost otapala mora biti dovoljno niska. Primjenom većeg protoka otapala smanjuje se granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestice, a time se ubrzava ekstrakcija. Materijale sa staničnom stijenkom potrebno je mehanički usitniti kako bi se smanjio otpor prilikom prodora otapala, odnosno kako bi se skratio put difuzije (Herceg, 2011).

Za postupak ekstrakcije koriste se različite brojne metode ekstrakcije. Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (suvremene) metode. U konvencionalne metode ekstrakcije ubrajaju se Soxhlet ekstrakcija, maceracija te vodena destilacija. Nekonvencionalne metode ekstrakcije uključuju metode potpomognute ultrazvukom, enzimima, mikrovalovima ili pulsirajućim električnim poljem, zatim ekstrakciju superkritičnim fluidom, pod tlakom i druge. Konvencionalne metode ekstrakcije temelje se na ekstrakciji pomoću otapala uz miješanje i/ili zagrijavanje smjese. Zbog negativnih strana konvencionalnih metoda kao što su dugo vrijeme ekstrakcije, potreba za otapalima visokog stupnja čistoće, potrebom za većom količinom otapala (jer dolazi do evaporacije velikog dijela otapala), niske ekstrakcijske selektivnosti, gubitka termolabilnih komponenata te ekonomskih i ekoloških razloga, sve se više razvijaju nekonvencionalne metode. Nekonvencionalnim metodama ekstrakcije, postiže se bolja ekstrakcija u kraćem vremenu s većom kvalitetom ekstrakta te manjom upotrebom otapala (Azmir i sur., 2013).

Nakon ekstrakcije, u dobivenom ekstraktu, biološki aktivni spojevi mogu se određivati na više načina primjenom različitih metoda analize; UV/Vis spektrofotometrijom, infracrvenim zračenjem, nuklearnom magnetskom rezonancijom, masenom spektrometrijom, kromatografskim metodama (Altemimi i sur., 2017).

2.3.1. Izbor otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva

Vrlo je bitan pravilan izbor otapala za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljaka. Odabire se otapalo koje ima sličnu polarnost kao tvar koja se želi ekstrahirati (Altemimi i sur., 2017). Najčešće korištena otapala prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva su voda, aceton, etil acetat, metanol, etanol, propanol te njihove mješavine. Optimalno otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva određene biljke ovisi o vrsti biljke, dijelu biljke koji se koristi te njenom sastavu aktivnih komponenata (Khoddami i sur., 2013).

Za ekstrakciju polifenola manje molekulske mase, općenito, kao bolje otapalo pokazao se metanol, no vrlo često se koristi etanol zbog manje štetnosti na okoliš i zdravlje ljudi. Za fenole veće molekulske mase, bolji rezultati postižu se korištenjem razrijeđenog acetona. Pri izolaciji fenola bogatih antocijaninima, kao otapalo koristi se kisela otopina metanola ili etanola (Dai i Mumper, 2010). Prilikom određivanja fenolnog sastava, koriste se različita otapala ovisno o spoju čija se koncentracija želi odrediti, primjerice Takahashi i sur. (2017) koristili su mješavinu voda/metanol/aceton (1/1/1, v/v) kao otapalo za određivanje koncentracije polifenola i furanokumarina, a metanolni ekstrakt za određivanje koncentracije glikozid psoralne kiseline lista smokve.

Ivanov i sur. (2015) određivali su ukupne fenole, Folin-Ciocalteu metodom, u ekstraktima lista smokve pripremljenih s različitim otapalima. Koristili su ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, a kao otapala korišteni su n-heksan, aceton, 95%-tni etanol, metanol i voda. Najveća koncentracija ukupnih fenola bila je prisutna u vodenom ekstraktu (6,6 mg GAE/g suhe tvari), potom u ekstraktu metanola (3,1 mg GAE/g suhe tvari), 95%-tnog etanola (2,5 mg GAE/g suhe tvari), acetona (1,5 mg GAE/g suhe tvari), dok je najniža koncentracija određena u ekstraktu n-heksana (0,6 mg GAE/g suhe tvari).

Ghazi i sur. (2012) određivali su ukupne fenolne sastojke ekstrakta lista smokve, koristeći kao otapalo 80 %-tni metanol i vodu. Uzorke su osušili zamrzavanjem, usitnili te kao metodu ekstrakcije koristili maceraciju. Udio ukupnih fenola bio je veći u vodenom ekstraktu (907,02 mg GAE/100 g za velike listove, 629,78 mg GAE/100 g za male listove) nego u metanolnom

ekstraktu (412,37 mg GAE/100 g za velike listove, 275,35 mg GAE/100 g za male listove).

2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija razvila se kao nekonvencionalna metoda ekstrakcije kasnih 70-tih (Blekić i sur., 2011). Odabrani uzorak uranja se u otapalo koje može apsorbirati mikrovalnu energiju, zatvara u ćeliju za ekstrakciju te tretira mikrovalovima (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000). Pomoću energije mikrovalova dolazi do olakšanog odvajanja željene biološki aktivne komponente iz matrice uzorka u odabrano, prikladno otapalo (Dai i Mumper, 2010). Najčešće korištena frekvencija mikrovalnih ekstraktora je 2450 MHz (Altemimi i sur., 2017).

Mikrovalovi su dio neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja u frekvencijskom rasponu od 300 MHz do 300 GHz. Sastoje se od međusobno okomitog, povezanog, oscilirajućeg električnog i magnetskog polja koji se šire prostorom (Altemimi i sur., 2017). Zbog ograničenog energetskog potencijala mikrovalova, njihovom upotrebom ne dolazi do promjene u strukturi tvari na koju djeluju, već samo do porasta temperature (Blekić i sur., 2011).

Zagrijavanje nastalo mikrovalnom energijom rezultat je izravnog djelovanja mikrovalova na molekule. Odnosno, mikrovalovi dovode do istodobnog nastanka ionske vodljivosti te dipolne rotacije. Elektroforetskim kretanjem iona kroz otapalo, pod utjecajem elektromagnetskog polja, dolazi do trenja koje dovodi do zagrijavanja uzorka. Dipolna rotacija također zagrijava uzorak jer dovodi do vibracije molekula prilikom promjene dipola $4,9 \times 10^9$ puta u sekundi pri korištenoj frekvenciji od 2450 MHz (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Prije samog procesa mikrovalne ekstrakcije vrlo često je potrebno je pripremiti uzorke na način da ih se osuši (sušenje zrakom ili sušenje zamrzavanjem) te usitni (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Važni parametri prilikom mikrovalne ekstrakcije o kojima ovisi uspješnost ekstrakcije željene komponente su vrsta otapala, količina otapala, temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije te karakteristike uzorka za ekstrakciju (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Otapalo za mikrovalnu ekstrakciju mora biti polarno ili imati ione, odnosno mora imati trajni dipolni moment kako bi moglo apsorbirati mikrovalnu energiju. Najčešće korištena otapala u mikrovalnoj ekstrakciji su aceton, acetonitril, etanol, heksan, metanol, 2-propanol, voda, heksan-aceton (1:1). Djelovanjem mikrovalova na nepolarna otapala, poput heksana, neće

doći do zagrijavanja, odnosno ekstrakcija će biti neefikasna. Osim što otapalo treba biti polarno, ono bi trebalo biti i što selektivnije prema analitu od interesa. Može se koristiti jedno otapalo koje snažno apsorbira mikrovalnu energiju (voda, etanol, diklormetan,..), mješavina otapala koje jako apsorbiraju mikrovalnu energiju u određenim omjerima (acetonitril-metanol (95:5), diklormetan-metanol (90:10), metanol-voda (80:20),..), mješavina otapala od kojih jedno snažno, a drugo slabo apsorbira energiju mikrovalova u određenim omjerima (heksan-aceton (1:1), etil acetat-cikloheksan (1:1), dodatak oko 10% vode u heksan, toluen ili ksilen..) ili nepolarno otapalo i to samo kod uzoraka koji imaju visoku dielektričnu konstantu, odnosno sadrže visok udio vode (na primjer, za ekstrakciju esencijalnih ulja iz biljnih materijala) (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Količina korištenog otapala, mora biti tolika da cijeli uzorak bude uronjen u njega (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

U zatvorenim ćelijama za ekstrakciju, moguće je zagrijati otapalo na temperaturu višu od temperature vrelišta tog otapala što rezultira efikasnijom i ubrzanom ekstrakcijom. Zbog povišene temperature može doći do degradacije određenih fenolnih spojeva (Biesaga, 2011). Tijekom mikrovalne ekstrakcije, otporniji na degradaciju, odnosno stabilniji, su fenolni spojevi koji sadrže manje supstituenata na aromatskom prstenu (Liazid i sur., 2007). Uglavnom, dovoljno vrijeme mikrovalne ekstrakcije je 10 minuta, dulje vrijeme ekstrakcije može dovesti do razgradnje termolabilnih komponenata (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Nakon mikrovalne ekstrakcije, a prije daljnje analize, u većini slučajeva, potrebni je odvojiti kruti materijal od dobivenog ekstrakta. To se postiže običnom filtracijom ili centrifugiranjem (Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Prednosti mikrovalne ekstrakcije nad konvencionalnim metodama su:

- brža ekstrakcija
- mogućnost ekstrakcije više uzoraka istovremeno
- smanjen volumen potrebnog otapala
- jednostavnost
- manja potrošnja energije
- ekološki prihvatljivija metoda
- efektivni prijenos energije na matriks, brzo zagrijavanje
- efektivnija ekstrakcija

- veća kvaliteta ekstrakta (Veggi i sur. 2012; Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Nedostatci mikrovalne ekstrakcije:

- otapalo mora imati sposobnost apsorpcije mikrovalova
- nakon ekstrakcije, potrebno razdvajanje krutog materijala od dobivenog ekstrakta (filtracijom ili centrifugiranjem)
- nakon ekstrakcije, potrebno pričekati da se ćelija za ekstrakciju ohladi
- moguća degradacija i gubitak termolabilnih i hlapljivih komponenata pri visokim temperaturama (Veggi i sur. 2012; Sparr Eskilsson i Björklund, 2000).

Yu i sur. (2020) istraživali su efikasnost primjene ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prilikom izolacije određenih polifenola i furanokumarina iz listova smokve. Zaključili su da je mikrovalna ekstrakcija, pri optimalnim uvjetima (omjer otapalo/uzorak 19,72 mL/g, temperatura ekstrakcije 40 °C, vrijeme ekstrakcije 10,27 min), prilikom izolacije određenih polifenola i furanokumarina efikasnija od konvencionalnih metoda ekstrakcije.

Mikrovalna ekstrakcija pokazala se kao efikasnija metoda za ekstrakciju biološki aktivnih molekula u usporedbi s konvencionalnim metodama, ali i nekim nekonvencionalnim (ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, ekstrakcijom superkričnim fluidom i ekstrakcijom pod tlakom) (Veggi i sur. 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci lista i peteljke smokve

Uzorci lista i peteljke smokve ubrani su u okolici Rovinja u listopadu 2020. godine, osušeni u zračnoj sušari pri temperaturi zraka 50 °C te čuvani u plastičnim vrećicama do danje analize. Korišteni su uzorci devet različitih sorti smokve te peteljke (tablica 2). Prije provođenja analize, suhi listovi i peteljke smokve usitnjeni su u električnom mlincu (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska).

Tablica 2. Popis analiziranih uzoraka, odnosno nazivi i sinonimi (u zagradama) analiziranih sorti smokve

Uzorci	
List	Peteljka
Miljska figa	Nepoznate sorte
Zimica (Zelenka, Ozmica)	
Panache (Tiger)	
Fico della Madonna (Matalon bijeli)	
Petrovača bijela (Petrovka bijela, Dvoljetka)	
Sušioka (Zamorčica, Sušilica, Poljarica, Tjenica)	
Bjelica (Bijelica, Bilica, Bjeluša, Morkinja)	
Petrovača crna (Dvorotka crna)	
Šaraguja (Crnica, Šaragulja)	

3.1.2. Kemikalije

Za mikrovalnu ekstrakciju i spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola iz lista i peteljke smokve (*Ficus* sp.) korištene su sljedeće kemikalije:

- Deionizirana voda
- Etanol, 96%-tni (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Etanol, 40%-tni

- Folin – Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach:ner, Beratovice, Češka Republika)

3.1.3. Otopine

- Etanol, 40%-tni
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 416,7 mL 96%-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Standard galne kiseline
Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici do 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

3.1.4. Instrumenti i pribor

- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g), (Sartorius analytic A200S, Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Mikrovalni ekstraktor (ETHOS EASY – Advanced Microwave Digestion System, Milestone Srl, Sorisole, Italy)
- UV/VIS spektrofotometar (VWR, UV-1600PC Spectrophotometer, Pennsylvania, SAD)
- Vodena kupelj (BÜCHI, Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka)
- Automatske pipete
- Čelija za ekstrakciju
- Filter papir
- Kapaljka
- Menzura od 50 mL
- Magneti
- Odmjerne tikvice od 50 mL
- Plastične kivete za čuvanje uzorka (50 mL)
- Stalak za epruvete

- Staklena čaša
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci
- Žličica

3.2. Metoda rada

Ekstrakti fenolnih spojeva iz osušenih i usitnjenih listova i peteljke smokve dobiveni su pomoću mikrovalova (mikrovalnom ekstrakcijom) pri čemu je kao otapalo korištena deionizirana voda, 40%-tni etanol ili 96%-tni etanol. Potom je u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski određen maseni udio fenolnih spojeva.

3.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

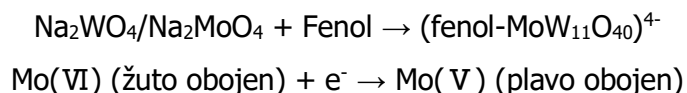
Mikrovalna ekstrakcija fenolnih spojeva iz osušenih i usitnjenih listova i peteljke smokve provedena je pri temperaturi 55 °C u trajanju od 10 minuta. S ciljem određivanja utjecaja vrste otapala na udio ukupnih fenola u ekstraktu lista smokve korištena su sljedeća otapala: deionizirana voda, 40%-tni etanol, 96%-tni etanol. Sve ekstrakcije provedene su pri konstantnoj snazi mikrovalnog ekstraktora (800 W).

U ćeliju za ekstrakciju odvaže se 1 g osušenog, usitnjenog lista smokve, prelije s oko 40 mL otapala te doda magnet. Po šest ćelija za ekstrakciju postavi se u mikrovalni ekstraktor na pozicije te provodi mikrovalna ekstrakcija na temperaturi 55 °C u trajanju od 10 minuta pri snazi mikrovalnog ekstraktora 800 W. Prije same mikrovalne ekstrakcije, mikrovalni ekstraktor jednu minutu zagrijava uzorak te nakon ekstrakcije jednu minutu hladi uzorak. Nakon ekstrakcije, uzorci se filtriraju kroz filter papir u odmjerne tikvice od 50 mL koje se potom nadopune do oznake odgovarajućim otapalom. Dobiveni ekstrakti čuvaju se u plastičnim kivetama na temperaturi od +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Količina ukupnih fenola u prethodno pripremljenim ekstraktima određena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se u blago alkalnim uvjetima pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u wolframov oksid

i molbidenov oksid. Nastali relativno stabilni kompleks wolframovog oksida i molbidenovog oksida daje plavo obojenje. Spektrofotometrijski se mjeri intenzitet nastalog plavog obojenja pri 765 nm te se iz dobivenih apsorbancija pomoću baždarnog pravca galne kiseline određuju maseni udjeli fenola. Što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima to će nastala plava boja biti intenzivnija (Shortle i sur., 2014).



3.2.2.1. Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C (u kupelji od rotavapora). Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 µL otapala za ekstrakciju (deionizirana voda, 40%-tni etanol i 96%-tni etanol). Zatim se na spektrofotometru mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

3.2.2.2. Izračun koncentracije ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola izračunava se pomoću baždarnog pravca koji pokazuje linearnu ovisnost apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L).

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

Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$Y = 0,0035 * X \quad (R^2=0,9995)$$

Gdje je: Y - apsorbancija pri 765 nm

X - koncentracija galne kiseline (mg GAE/L)

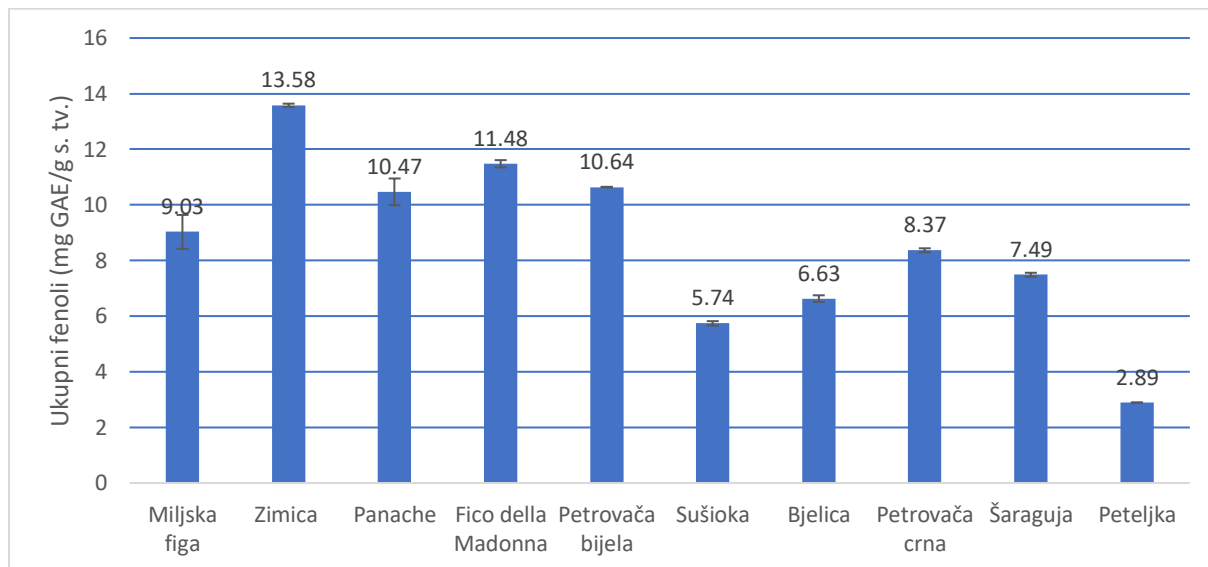
R² - koeficijent determinacije

U jednadžbu baždarnog pravca uvrste se dobivene apsorbancije (Y) uzoraka te se izračuna koncentracija ukupnih fenola izraženih preko galne kiseline u ekvivalentima galne kiseline po 1 L ekstrakta. Kako bi se koncentracija izrazila po gramu suhog lista, dobivena koncentracija podijeli se s ukupnom masom u L ekstrakta koja se izračuna preko omjera mase (m) samljevenog suhog lista smokve korištenog za ekstrakciju i konačnog volumena (V) na koji je ekstrakt razrijeđen. Naposljetku, udjeli ukupnih fenola izražavaju se u mg GAE/g osušenog lista smokve kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

$$X \text{ (mg GAE/g)} = X \text{ (mg GAE/L)} \times V \text{ (L)} / m \text{ (g)}$$

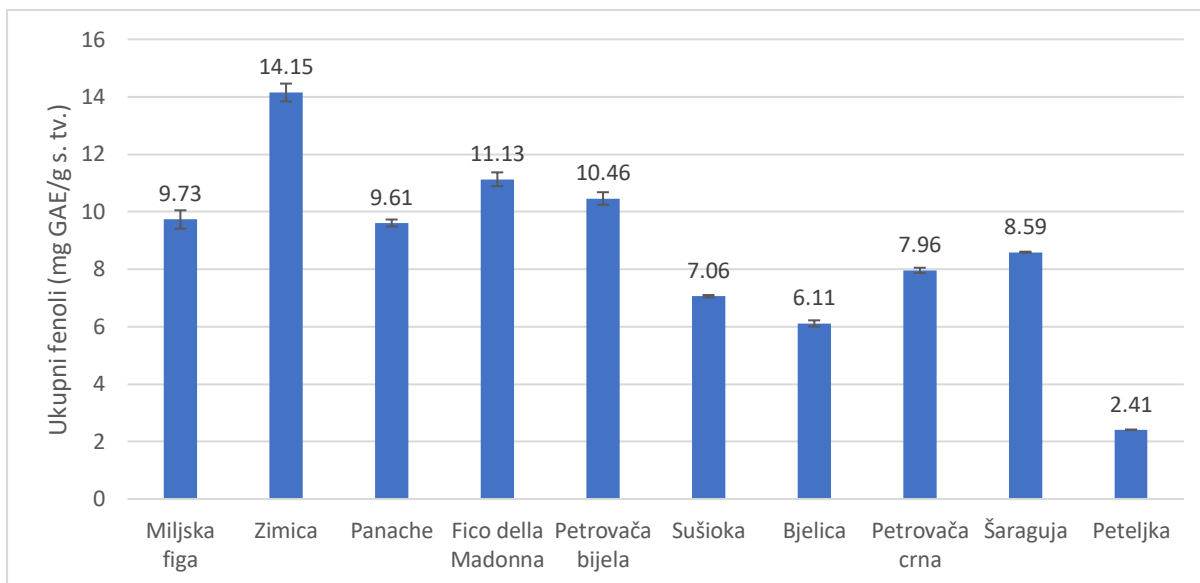
4. REZULTATI I RASPRAVA

Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 6. – 8.).



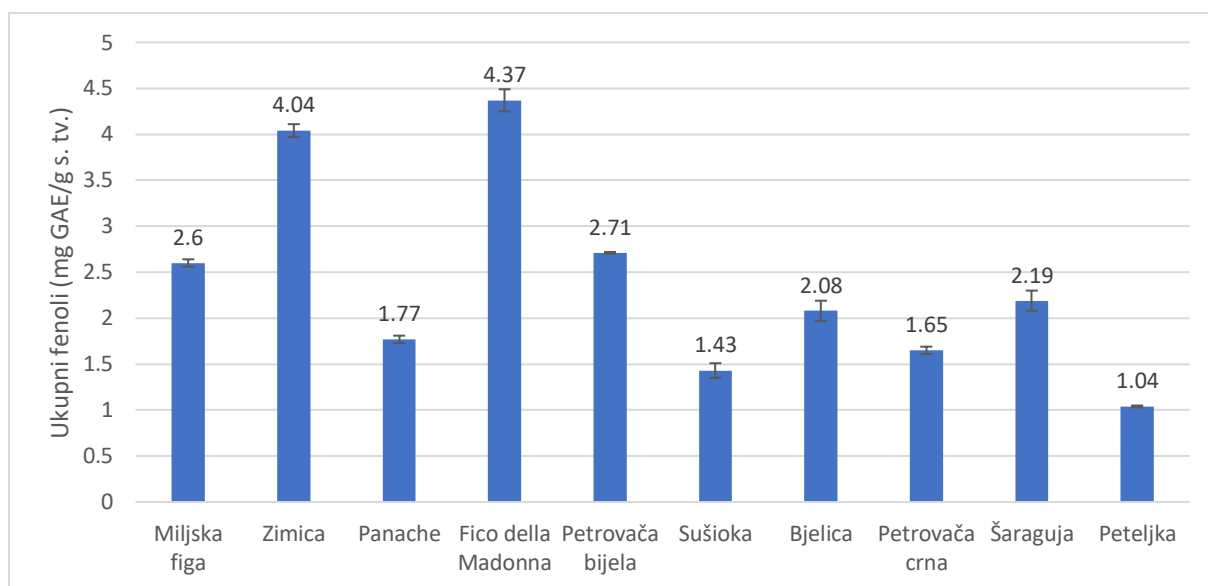
Slika 6. Udjeli ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE/g s. tv.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenih listova i peteljke smokve uz deioniziranu vodu kao otapalo

Udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu listova smokve (slika 6.) kreće se od 5,74 mg GAE/g suhog lista do 13,58 mg GAE/g suhog lista. Najveći udio ukupnih fenola pokazuje sorta Zimica, a druga po redu je sorta Fico della Madonna. Najmanji udio ukupnih fenola izmjerena je u sorti Sušioka, a nešto veći u sorti Bjelica. Zimica ima dva puta više fenolnih spojeva od Sušioke. U ekstraktu peteljke određen je znatno manji udio ukupnih fenola u odnosu na sve uzorke ekstrakta lista.



Slika 7. Udjeli ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE/g s. tv.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenih listova i peteljke smokve uz 40%-tni etanol kao otapalo

Izmjereni udjeli ukupnih fenola u ekstraktu 40%-tnog etanola (slika 7.) kreću se od 6,11 mg GAE/g suhog lista do 14,15 mg GAE/g suhog lista. U sorti Zimica izmjeren je najveći udio ukupnih fenola, a nešto niži udio izmjeren je u sorti Fico della Madonna. Najniži udio ukupnih fenola zabilježena je kod sorte Bjelica, a nešto viši u sorti Sušioka. Zimica ima više od dva puta više fenolnih spojeva od Bjelice. U ekstraktu peteljke određen je znatno manji udio ukupnih fenola u odnosu na sve uzorke ekstrakta lista.



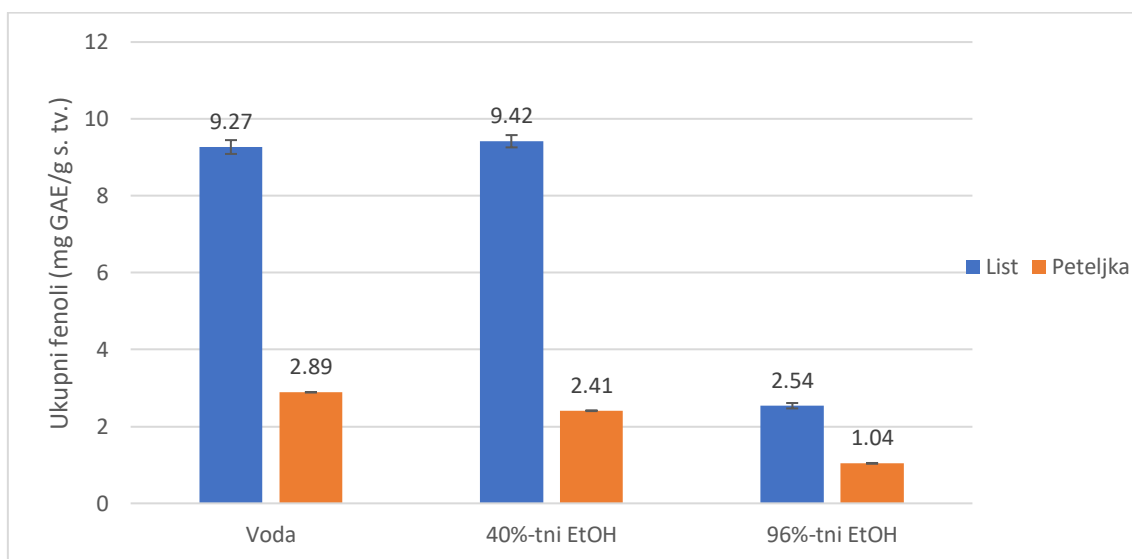
Slika 8. Udjeli ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE/g s. tv.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz osušenih listova i peteljke smokve uz 96%-tni etanol kao otapalo

U ekstraktu 96%-tnog etanola (slika 8.) zabilježen je udio ukupnih fenola od 1,43 mg GAE/g suhog lista do 4,37 mg GAE/g suhog lista. Najviši udio ukupnih fenola imala je sorta Fico della Madonna, zatim sorta Zimica. U sorti Sušioka izmjereno je najmanji udio ukupnih fenola, a u sorti Petrovača crna nešto viši. Najmanji izmjereno udio ukupnih fenola manji je od najvišeg izmjereno udjela ukupnih fenola za 3 puta. U ekstraktu peteljke određen je manji udio ukupnih fenola u odnosu na sve uzorke ekstrakta lista.

Najveći udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu i 40%-tnom etanolnom ekstraktu pokazuje sorta Zimica, a zatim Fico della Madonna. Vrlo slično je i u 96%-tnom etanolnom ekstraktu, no ovdje najveći udio ima sorta Fico della Madonna, a zatim Zimica. S druge strane, najniži udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu i 40%-tnom etanolnom ekstraktu zabilježen je u sortama Sušioka i Bjelica. U vodenom ekstraktu udio ukupnih fenola bio je niži u sorti Sušioka, dok je u 40%-tnom etanolnom ekstraktu udio ukupnih fenola bio niži u sorti Bjelica. U 96%-tnom etanolnom ekstraktu najniži udio ukupnih fenola određen je kod Sušioke. Zanimljivo je da u 96%-tnom etanolnom ekstraktu, nakon Sušioke, najniži udio ukupnih fenola ima Petrovača crna, zatim Panache, a tek onda Bjelica.

Prema dobivenim rezultatima najveći udio ukupnih fenola za više sorti zabilježen je u vodenom ekstraktu (sorte: Panache, Fico della Madonna, Petrovača bijela, Bjelica, Petrovača crna). S

druge strane, za sorte Miljska figa, Zimica, Sušioka te Šaraguja najveći udio ukupnih fenola određena je u 40%-tnom etanolnom ekstraktu. Treba napomenuti da izmjerene udjeli ukupnih fenola u vodenom ekstraktu i 40%-tnom etanolnom ekstraktu nisu znatno različiti. S druge strane, izmjerene vrijednosti udjela ukupnih fenola u 96%-tnom etanolnom ekstraktu znatno su manje od onih izmjerenih u vodenom ekstraktu i 40%-tnom etanolnom ekstraktu. Vrijednosti udjela ukupnih fenola u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu kreću se od 5,74 mg GAE/g suhog lista pa sve do 14,15 mg GAE/g suhog lista, dok one u 96%-tnom etanolnom ekstraktu ne prelaze 4,37 mg GAE/g suhog lista.



Slika 9. Prosječni udjeli ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE/g s. tv.) ekstrakta lista smokve svih sorti za pojedina otapala prikazane zajedno s udjelima ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE/g s. tv.) izmjerenih za peteljku u pojedinim otapalima

Iako je za više sorti viši udio ukupnih fenola izmjeren u vodenom ekstraktu, ipak je prosječna vrijednost udjela ukupnih fenolnih spojeva svih sorti nešto malo veća u 40%-tnom etanolnom ekstraktu odnosno na vodeni ekstrakt (slika 9.). To ukazuje na vrlo malu razliku između izmjerenih vrijednosti udjela ukupnih fenolnih spojeva između vodenog i 40%-tnog ekstrakta. Također, vrlo lijepo se grafički (slika 9.) vidi koliko su voda i 40%-tni etanol bolja otapala za ukupne fenolne spojeve za razliku od 96%-tnog etanola koji se pokazao kao vrlo loše otapalo. Više od tri puta veći udio ukupnih fenola izmjeren je kada se kao otapalo za ekstrakciju koristila voda ili 40%-tni etanol od onda kada se za ekstrakciju koristio 96%-etanol. U ekstraktima peteljke određen je više od dva puta veći udio ukupnih fenola u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu, nego u 96%-tnom etanolnom ekstraktu.

Vrijednosti izmjerenih udjela ukupnih fenola u osušenim peteljčkama značajno su niži od onih izmjerenih u suhim listovima smokve. Kao i u listovima, tako i u peteljčkama, veći udio ukupnih fenolnih spojeva izmjeren je u vodenom i 40%-tnom etanolnom ekstraktu (2,89 i 2,41 mg GAE/g suhe peteljke), nego u 96%-tnom etanolnom ekstraktu (1,04 mg GAE/g suhe peteljke).

Ivanov i sur. (2015) ekstrahirali su fenolne spojeve listova smokve pomoću ultrazvuka u različitim otapalima, između ostalog u vodi i 95%-tnom etanolu. Iako su izmjerene niže vrijednosti udjela ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na one izmjerene u ovom radu, zaključak je jednak, voda je znatno bolje otapalo od 95%-tnog etanola jer je dobivena vrijednost udjela ukupnih fenola više od dva puta veća u vodenom nego u 95%-tnom etanolu. Do zaključka da je voda bolje otapalo za fenolne spojeve listova smokve od etanola došli su i Konyalıođlu i sur. (2005) koji su izmjerili više vrijednosti udjela ukupnih fenolnih spojeva vodenog ekstrakta lista smokve nego etanolnog. Konyalıođlu i sur. (2005) uzorke su osušili na sobnoj temperaturi te ih usitnili u grubi prah, kao metodu ekstrakcije koristili su maceraciju, a ukupne fenolne spojeve određivali su Folin-Ciocalteu metodom te izmjerili 6.909 ± 0.108 mg GAE/g suhe tvari u vodenom ekstraktu te 4.545 ± 0.089 mg GAE/g suhe tvari u etanolnom ekstraktu.

Essid i sur. (2015) određivali su ukupne fenolne spojeve u vodenim ekstraktima listova 20 sorti tuniskih smokava. Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenolnih spojeva, određenih pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, bila je $20,82 \pm 5.94$ mg GAE/g suhe tvari što je viša vrijednost od one izmjerene u ovom radu. Jedan od faktora koji utječe na količinu ukupnih fenola je i način pripreme samog uzorka. Jahangiri i sur. (2011) istraživali su utjecaj pripreme uzorka na količinu ukupnih fenolnih spojeva uspoređujući količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva iz svježe zamrznutih listova smokve s količinom ekstrahiranih fenolnih spojeva listova smokve osušenih u pećnici. Svježe zamrznuti uzorci imali su viši udio ukupnih fenola od uzoraka koji su prije ekstrakcije bili sušeni u pećnici. Vrijednost ukupnih fenolnih spojeva za svježe zamrznuti uzorak u 95%-tnom etanolnom ekstraktu bila je 66.55 ± 1.58 mg GAE/ 100 g suhe tvari, a za uzorak sušen u pećnici 52.41 ± 1.64 mg GAE/ 100 g suhe tvari.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata, proizlaze sljedeći zaključci:

1. U vodenom ekstraktu najveći izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 13,58 mg GAE/g suhog lista (sorta Zimica), a najmanji izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 5,74 mg GAE/g suhog lista (sorta Sušioka).
2. U 40%-tnom etanolnom ekstraktu najveći izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 14,15 mg GAE/g suhog lista (sorta Zimica), a najmanji izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 6,11 mg GAE/g suhog lista (sorta Bjelica).
3. U 96%-tnom etanolnom ekstraktu najveći izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 4,37 mg GAE/g suhog lista (sorta Fico della Madonna), a najmanji izmjereni udio ukupnih fenola iznosi 1,43 mg GAE/g suhog lista (sorta Sušioka).
4. Peteljka sadrži znatno manji udio ukupnih fenolnih spojeva od lista smokve, izmjereni udio ukupnih fenolnih spojeva u peteljki bio je najveći u vodenom ekstraktu (2,89 mg GAE/g suhe peteljke), nešto malo niži u 40%-tnom etanolnom ekstraktu (2,41 mg GAE/g suhe peteljke), a dvostruko niži u 96%-tnom etanolnom ekstraktu (1,04 mg GAE/g suhe peteljke).
5. Deionizirana voda i 40%-tni etanol pokazali su se kao bolja otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva između čijih ekstrakata nije bilo znatnije razlike u izmjerenim udjelima ukupnih fenolnih spojeva, dok se kao najlošije otapalo pokazao 96%-tni etanol u čijim su ekstraktima izmjereni najniži udjeli ukupnih fenolnih spojeva.
6. U svim otapalima (deionizirana voda, 40%-etanol, 96%-etanol) najviši udio ukupnih fenolnih spojeva, određenih Folin-Ciocalteu metodom, imale su sorta Zimica te sorta Fico della Madonna.

6. POPIS LITERATURE:

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

Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A. (2017) Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* **6**: 42.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**(4): 426-436.

Biesaga M. (2011) Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1218**(18): 2505-2512.

Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3**(1): 32-47.

Essid A., Aljane F., Ferchichi A. (2015) Mineral and phenolic content of leaves of Tunisian caprifig (*Ficus carica* L.) accessions. *Journal of Crop Science and Biotechnology* **21**: 977–984.

Čović D., Bojić M., Medić-Šarić M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina., *Farmaceutski glasnik* **65**: 693 – 704.

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties *Molecules* **15**: 7313 – 52.

Dragovic-Uzelac V., Levaj V., Mrkic V., Bursac D., Boras M. (2007) The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* **102**(3): 966 - 975.

Ghazi F., Rahmat A., Yassin Z., Ramli N., Buslima N. A. (2012) Determination of Total Polyphenols and Nutritional Composition of Two Different Types of *Ficus carica* Leaves Cultivated in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Nutrition* **11**: 1061 - 1065.

Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, Plejada, Zagreb, str. 98 - 103.

Hrvatsko biološko društvo, <<http://www.hbd-sbc.hr>> Pristupljeno 16. srpnja 2021.

Ivanov I., Dencheva N., Petkova N., Denev P. (2015) Determination of total polyphenols and antioxidant activity of different extracts from *Ficus carica* L. *Applied Researches in Technics, Technologies and Education* **3**: 87 - 92.

Jahangiri Y., Ghahremani H., Torghabeh J.A., Salehi E.A. (2011) Effect of temperature and solvent on the total phenolic compounds extraction from leaves of *Ficus carica*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **3**: 253 - 259.

Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 – 2375.

Konyalıoğlu, S., Sağlam, H., Kivçak, B. (2005) α -tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of *Ficus carica* leaves. *Pharmaceutical Biology* **43**(8): 683 - 686.

Li Z., Yang Y., Liu M., Zhang C., Shao J., Hou X., Tian J., Cui Q. (2021) A comprehensive review on phytochemistry, bioactivities, toxicity studies, and clinical studies on *Ficus carica* Linn. Leaves. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **137**: 111393.

Liazid A., Palma M., Brigui J., Barroso C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction., *Journal of Chromatography A* **1140**(1-2): 29 - 34.

Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva Zagreb, HINUS Miramarska 13b, 299 - 300.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**(5): 727 – 747.

Mawa S., Husain K., Jantan I. (2013) *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* doi: 10.1155/2013/974256.

Nadeem M., Zeb A. (2018) Impact of maturity on phenolic composition and antioxidant activity of medicinally important leaves of *Ficus carica* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **24**(5): 881 - 887.

Prgomet, Ž., Prgomet, I. (2020) Smokva (*Ficus carica* L.), 2. izd., Skink d.o.o., Rovinj. str. 10-31.

Shortle E., O'Grady M. N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**: 828 - 834.

Solana, R. R., Romano, A. (2020) Chemical and biological characteristic of *Ficus carica* L. Fruits, leaves, and derivatives (wine, spirit, and liqueur). U: Modern Fruit Industry, Kahramanoglu, I., ur, IntechOpen, str. 109 - 127.

Sparr Eskilsson C., Björklund E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **902**(1): 227 - 250.

Takahashi T., Okiura A., Kohno M (2017) Phenylpropanoid composition in fig (*Ficus carica* L.) leaves. *Journal of Natural Medicines* **71**: 770 – 775.

Veggi P. C., Martinez J., Meireles M. A. A. (2012) Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds, 1. izd., Chemat F., Cravotto G., ur., Springer US. str. 15 - 52.

Vermerris W., Nicholson R. (2006) Phenolic Compound Biochemistry, 1. izd., Springer. str.1.

Yu L., Meng Y., Wang Z., Cao L., Liu C., Gao M., Zhao C., Fu Y. (2020) Sustainable and efficient surfactant-based microwave-assisted extraction of target polyphenols and furanocoumarins from fig (*Ficus carica* L.) leaves. *Journal of Molecular Liquids* **318**:114196.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Paula Šiptar

ime i prezime studenta