

Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz suhe kore rajčice

Roguljić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:745602>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Sara Roguljić
0058217526**

**ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ SUHE KORE RAJČICE
ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:
PRIMA H2020 GA2032, FunTomP – Functionalized Tomato Products**

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ SUHE KORE RAJČICE

Sara Roguljić, 0058217526

Sažetak:

U ovom završnom radu ekstrahirane su bioaktivne komponente suhe kore rajčice primjenom ultrazvuka i toplinske metode pri 60 °C. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je deionizirana voda i 50 %-tni etanol. Antioksidacijska aktivnost određivana je FRAP i DPPH metodama. Optimizacijom uvjeta ekstrakcije ispitani su utjecaji amplitude (75 i 100 %), vremena (3 i 9 min) te ekstrakcijskog otapala (deionizirana voda i 50 %-tni etanol) na antioksidacijsku aktivnost. Provedena je statistička analiza pomoću programa STATGRAPHICS. Niti jedan parametar se nije pokazao statistički značajni na vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($p > 0,05$) za ultrazvučnu ekstrakciju. Optimalni parametri za dobivanje najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dobivene su pri amplitudi od 100%, vremenu 9 minuta te korištenjem 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Obradom podataka mjerenja pH i električne vodljivosti koncentracija etanola u uzorku pokazala se statistički značajnom.

Ključne riječi: kora rajčice, ultrazvuk, antioksidacijska aktivnost, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, toplinska metoda

Rad sadrži: 39 stranica, 13 slika, 16 tablica, 34 literaturnih 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. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: mag. ing., Josipa Dukić

Datum obrane: 14. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of General Programmes
Laboratory for sustainable development
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Ultrasound extraction of bioactive components from dried tomato peel

Sara Roguljić, 0058217526

Abstract:

In this undergraduate thesis, the bioactive components of tomato peel were extracted using ultrasound and thermal method at 60 °C. As the extraction solvent, deionized water and 50% ethanol were used. Antioxidant activity was determined by FRAP and DPPH methods. By optimizing the extraction conditions, the effects of amplitude (75 and 100%), time (3 and 9 min) and extraction solvent (deionized water and 50% ethanol) on antioxidant activity were examined. Statistical analysis was performed using the STATGRAPHICS program. Not a single parameter was found to be statistically significant on the value of antioxidant activity ($p > 0.05$) for ultrasound extraction. The optimal parameters for achieving the greatest value of antioxidant activity in ultrasound-assisted extraction were obtained at an amplitude of 100%, a time of 9 minutes and using 50% ethanol as an extraction solvent. Statistical analysis of the results of pH and electrical conductivity measurements showed that the concentration of ethanol in the sample was statistically significant.

Keywords: tomato peel, ultrasound, antioxidant activity, ultrasound-assisted extraction, thermal method

Thesis contains: 39 pages, 13 figures, 16 tables, 34 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD

Technical support and assistance: Josipa Dukić, MSc.

Thesis defended: July 14, 2023

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Održivost i „zero waste“ proizvodnja.....	2
2.2. Rajčica i kora rajčice.....	3
2.3. Antioksidacijske komponente rajčice.....	4
2.4. Antioksidacijska aktivnost.....	6
2.5. Ultrazvuk.....	7
2.6. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	8
2.7. Liofilizacija.....	9
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1.Materijali.....	10
3.1.1. Uzorak.....	10
3.1.2. Reagensi i kemikalije.....	10
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pri- bor.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....	13
3.2.2. Toplinska ekstrakcija.....	13
3.2.3. Mjerenje pH i električne provodljivosti.....	14
3.2.4. Liofilizacija.....	14
3.2.5. FRAP metoda.....	14
3.2.6. DPPH metoda.....	16
3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase.....	17
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Rezultati.....	18

4.1.1. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka.....	18
4.1.2. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod toplinski tretiranih uzoraka.....	26
4.1.3. Rezultati mjerenja pH i električne vodljivosti uzoraka.....	28
4.2. Statistička obrada podataka.....	21
4.2.1. Statistička obrada rezultata antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom.....	21
4.2.2. Statistička obrada rezultata antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom.....	23
4.2.3. Statistička obrada pH vrijednosti ultrazvučno tretiranih uzoraka.....	28
4.2.4. Statistička obrada električne vodljivosti.....	30
 5. ZAKLJUČCI.....	 34
6. LITERATURA.....	35

1.UVOD

Industrijskom preradom rajčice nastaje znatna količina preostale sirovine, koja se sastoji od kore, sjemenki i dijela pulpe. Sporedni dijelovi rajčice kao nedovoljno iskorišteni resursi procjenjuju se na iznos od 3 milijuna metričkih jedinica godišnje u Europi, uz pretpostavku da 15 % otpada nastaje u industriji prerade rajčice, a 5 % otpada na tržištu svježih rajčica. Zbog činjenice da otpad od rajčice obično predstavlja ekološki problem za industriju, njegova potencijalna ponovna uporaba za ekstrakciju različitih spojeva, poput likopena, dijetalnih vlakana, pektina, proteina i ulja, mogla bi biti od koristi (Ninčević Grassino i sur., 2020).

Korištenje ultrazvuka je čista, zelena tehnologija ekstrakcije za različite molekule i biomaterijale, uključujući polisaharide, eterična ulja, proteine, peptide, fine kemikalije (boje i pigmente) i bioaktivne molekule od komercijalne važnosti. Primjena ultrazvuka za ekstrakciju, porasla je posljednjih desetljeća zbog nekoliko nedostataka povezanih s konvencionalnim i nekim drugim tehnikama ekstrakcije, kao što su velika kapitalna ulaganja, velika potrošnja energije, visoka emisija CO₂ i potrošnja toksičnih organskih otapala i njihovih ostataka u ekstraktu (Tiwari, 2015).

Cilj ovog završnog rada je izolirati bioaktivne komponente kore rajčice koje imaju antioksidacijsku aktivnost primjerenom konvencionalne metode ekstrakcije (toplinska ekstrakcija pri 60 °C) i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, te usporedba antioksidacijske aktivnosti uzoraka ekstrahirani tim metodama. Antioksidacijska aktivnost određuje se testom redukcije antioksidacijske snage željezom (FRAP test) i 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testom. Osim usporedbe metoda ekstrakcije, prati se i utjecaj parametra amplitude, vremena tretiranja i udjela etanola kao ekstrakcijskog otapala i utjecaj njihovog međusobnog djelovanja na ukupnu antioksidacijsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Održivost i „zero waste“ proizvodnja

Ostatak hrane i otpad dobiven tijekom proizvodnje trenutno predstavljaju velik izazov u dizajniranju održivih sustava hrane. Gubitci hrane predstavljaju ekonomske gubitke za sve sektore u lancu prehrambene proizvodnje, uključujući i potrošače; hrana nije svima jednako dostupna i nije jednoliko raspoređena. Također, predstavljaju i loše iskorištenje resursa (voda, energija, tlo), te imaju negativan utjecaj na klimatske promjene i doprinose raznim negativnim socijalnim utjecajima (npr. glad u nerazvijenim zemljama) (FAO, 2019).

Godišnje, jedna trećina proizvedene hrane za ljudske potrebe postane otpad. Postoji izrazita potreba za razvojem i provedbom politika i praksi koje osiguravaju univerzalni pristup izboru zdrave hrane za rastuću svjetsku populaciju, istovremeno smanjujući utjecaj globalnog prehrambenog sustava na okoliš. Svjetsko stanovništvo povećalo se za dvije milijarde tijekom posljednjih 25 godina, a predviđa se da će dosegnuti 8,5 milijardi do 2030. godine i 9,8 milijardi 2050 (United Nations World Population Division, 2017). Porast populacije, ekonomični rast, urbanizacija i porast životnog standarda su značajno ubrzali proizvodnju hrane i količinu otpada u svijetu. Posljedice proizvodnje hrane su: degradacija zemljišta, krčenje šuma, gubitak staništa i bio raznolikosti, iscrpljivanje prirodnih resursa i kontaminaciju zraka, tla i vode (IPBES, 2018; Lindgren i sur., 2018; Whitmee i sur., 2015).

Proizvodnja hrane je jedan od mnogih faktora koji pridonose ekonomskom rastu (Singh i sur., 2017). „Zero waste“ proizvodnja se predlaže kao jedan od načina za rješavanje problema prethodno navedenih u ovom poglavlju (Qingbin i sur., 2015). „Zero waste“ proizvodnja kontinuirano potiče proizvođače i potrošače da usvoje održive prakse u cilju da smanje svoje rashode te pomognu stvaranju boljeg svijeta. „Zero waste“ se podržava recikliranjem i ponovnim korištenjem otpada koji je proizveden u proizvodnom procesu, teorijom održive proizvodnje i razvojem preciznih proizvodnih sustava, te je cilj eliminacija otpada, a ne upravljanje tim otpadom. Također je važno napomenuti da se otpad ne smije odlagati bez prethodnog zbrinjavanja jer može predstaviti higijenske probleme i biti štetan za okoliš. Također zahtijeva posebni prostor i izaziva troškove povezane s odlaganjem otpada (Singh i sur., 2017).

2.2. Rajčica i kora rajčice

Rajčica (lat. *Solanum lycopersicum*) je cvjetnica iz porodice pomoćnica (*Solanaceae*) koja se intenzivno uzgaja zbog jestivih plodova. Plod se često konzumira sirov u salatama, kao kuhano povrće i koristi se kao sastojak u različitim jelima. Nadalje, velike količine rajčica se koristi u prerađenim proizvodima kao što su: sok od rajčice, kečap, pasirana rajčica, sušene rajčice, rajčice u salamuri i sl. (Encyclopedia Britannica, 2023).



Slika 1. Rajčica (Encyclopedia Britannica, 2023.)

Rajčice i proizvodi od rajčice bogati su izvori folata, vitamina C i kalija. Od fitonutijenata, u rajčici su najzastupljeniji karotenoidi. Likopen je najistaknutiji karotenoid, a slijede ga beta-karoten, gama-karoten i fitoen, kao i nekoliko manjih karotenoida (Beecher, 1998). Antioksidacijska aktivnost likopena, kao i nekoliko drugih karotenoida i njihovo obilje u rajčicama čini ovu hranu bogatim izvorima antioksidacijske aktivnosti (Beecher, 1998). Poznata je zaštitna uloga rajčice kod ljudi od raznih degenerativnih bolesti. Konzumacija rajčice rezultira smanjenju učestalosti raka, kardiovaskularnih bolesti, starenja i mnogih drugih zdravstvenih problema (Chaudhary i sur., 2018).

Rajčica je također i izvrstan izvor vitamina A i B te raznih minerala (željezo, kalcij, fosfor, natrij, kalij). Konzumacija 230 g rajčice može osigurati oko 60% preporučenog dnevnog unosa vitamina C u odraslih i 85 % kod djece. U Tablici 1. nalaze se vitaminske i minerale komponente prisutne u rajčici (Sainju i sur., 2003).

Tablica 1. Vitaminske i mineralne komponente rajčice (u 100 g uzorka) (Sainju i sur., 2003)

<i>Opis</i>	<i>Nezrela rajčica</i>	<i>Zrela rajčica</i>
<i>Ca (mg)</i>	13	13
<i>P (mg)</i>	27	27
<i>Fe (mg)</i>	0.5	0.5
<i>Na (mg)</i>	3	3
<i>K (mg)</i>	244	244
<i>Vitamin A (I.U.)</i>	270	900
<i>Tiamin (mg)</i>	0.06	0.06
<i>Riboflavin (mg)</i>	0.04	0.04
<i>Niacin (mg)</i>	0.5	0.7
<i>Asorbinska kiselina (mg)</i>	20	23

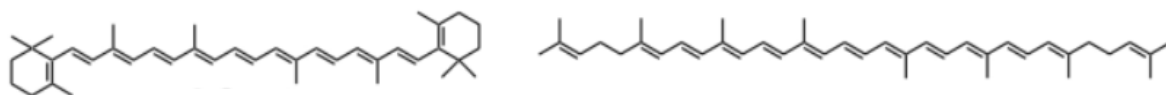
Kora rajčice je bogatija likopenom i fenolnim spojevima od pulpe (George i sur., 2004). Polifenolni spojevi nalaze se uz staničnu stjenku, a likopen unutar kromoplasta, te je potrebno provesti ekstrakciju kako bi se ovi bioaktivni spojevi uspjeli izdvojiti iz rajčice. Kora rajčice se suši u bubnju, melje i homogenizira kako bi se olakšao transport i skladištenje bioaktivne tvari ostataka, proizvodeći proizvod s oko 75 % ukupnih dijetalnih vlakana. Kao što je već navedeno, kora rajčice također imaju visok sadržaj antioksidansa (fenolni spojevi i likopen). Dakle, smatra se dobrom sirovinom za upotrebu u prehrambenoj industriji, čime dolazi do smanjenja onečišćenja okoliša povezanog nakupljanjem ostataka od prerade rajčice. Osim u prehrambenoj industriji, kora rajčice također se koristi u farmaceutskoj industriji, zbog zdravstvenih svojstava dijetalnih vlakana i bioaktivnih spojeva (Navarro-González i sur., 2011).

2.3. Antioksidacijske komponente rajčice

Antioksidanti su definirani kao bilo koja tvar koja usporava, sprječava ili uklanja štetu u stanici koja je uzrokovana oksidativnim stresom (Gulcin, 2020). Antioksidacijske tvari reagiraju sa slobodnim radikalima, čime produžuju rok trajanja proizvoda jer usporavaju proces lipidne oksidacije (Halliwell, 1997). Također su bitni za ljudsko zdravlje, jer kao što je već navedeno, usporavaju lipidnu oksidaciju te usporavaju procese raznih kroničnih bolesti (kardiovaskularne bolesti, dijabetes, itd.) (Gulcin, 2020).

Antioksidanti se često dodaju u hranu kao dodatak zbog mogućnosti produljenja roka trajanja proizvoda i benefita za ljudsko zdravlje. Antioksidanti u prehrani moraju biti stabilni, jeftini i ne toksični pri niskim koncentracijama, te ne smiju imati miris, okus i boju. Antioksidante možemo podijeliti na sintetske i prirodne. Najčešće korišteni sintetski antioksidanti su butil-rani hidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), tert-butilhidrokinon (TBHQ), propil-galat (PG) i oktil-galat (OG). Prirodni antioksidanti se nalaze u biljkama, tj. u svim njihovim dijelovima: voće, povrće, sjemenke, korijeni, listovi i kore. Najistaknutiji predstavnici prehrambenih antioksidansa su vitamin C, tokoferoli, karotenoidi i flavonoidi. Kao što je već navedeno, kora rajčice je bogata likopenom i fenolnim spojevima, te su oni detaljnije opisani u daljnjem tekstu (Gulcin, 2020).

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji su građeni od 15 ugljikovih atoma, s 2 aromatična prstena koji su spojeni mostom izgrađenim od 3 ugljikova atoma. Ovisno o modifikacijama centralnog C-prstena, mogu se podijeliti na flavonole, flavone, flavan-3-ole, flavanole, izoflavone i antocijane (Jaganath i Crozier, 2010). Glavna biološka aktivnost flavonoida je njihova antioksidacijska aktivnost. Flavonoidna antioksidacijska aktivnost može spriječiti oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima putem uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta, aktivaciju antioksidacijskih enzima, inhibiciju oksidaza i redukciju α -tokoferilnih radikala. (Shen i sur., 2022).



Slika 2. Struktura β -karotena (lijevo) i likopena (desno) (Maoka, 2020)

Karotenoidi su tetraterpenski pigmenti žute, narančaste, crvene i ljubičaste boje. Većina karotenoida sastoji se od osam izoprenskih jedinica s kosturom od 40 ugljika. Njihove strukture obično se sastoje od polienskog lanca s devet konjugiranih dvostrukih veza i krajnje skupine na oba kraja polienskog lanca. Karotenoidi se dijele u dvije skupine: karoteni i ksantofili (Maoka, 2020).

Likopen, koji pripada karotenoidima, tetraterpenski je spoj koji se u izobilju nalazi u rajčici i proizvodima od rajčice. Temeljno je prepoznat kao snažan antioksidant i karotenoid koji nije provitamin A. Utvrđeno je da je likopen učinkovit u ublažavanju pojava raka, dijabetesa melitusa, srčanih komplikacija, posljedica uzrokovanih oksidativnim stresom, upala, bolesti kože i kostiju, jetrenih i reproduktivnih poremećaja (Imran i sur., 2020).

2.4. Antioksidacijska aktivnost

Učinkovitost antioksidacijskih spojeva ovisi o nekoliko čimbenika, a najvažniji su: strukturna svojstva, temperatura, karakteristike supstrata podložnog oksidaciji, koncentracija, prisutnost sinergističkih i prooksidacijskih spojeva. Metode i instrumenti koji se koriste za mjerenje antioksidacijske aktivnosti značajno su se unaprijedili u posljednjih nekoliko desetljeća (Munteanu i Apetrei, 2021). Standardizirana metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti komponente hrane treba zadovoljiti sljedeće idealne zahtjeve: korišteni radikalni izvor mora biti biološki relevantan, poželjno je da metoda bude jednostavna, korištena metoda mora imati definiranu krajnju točku i kemijski mehanizam, instrumenti i kemikalije moraju biti lako dostupni, ponovljivost unutar ciklusa i između dana je odgovarajuća, te metoda mora biti primjenjiva za analize kontrole kvalitete (Gulcin, 2020).

Kapacitet apsorpcije radikala kisika test (ORAC test) mjeri sposobnost cijepanja lančane reakcije radikala pomoću antioksidanta kroz praćenje inhibicije oksidacije peroksilnog radikala. Peroksilni radikal koji emitira generator reagira s fluorescentnim uzorkom što dovodi do gubitka fluorescencije. Gubitak fluorescencije se mjeri na fluorimetru. Trolox se uzima kao standardni antioksidant, te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti Trolox-a. ORAC test je test temeljen na prijenosu vodikovog atoma, tj. *Test based on the transfer of the hydrogen atom* (HAT test). To su testovi koji mjere sposobnost antioksidanta da ukloni slobodne radikale doniranjem atoma vodika (Munteanu i Apetrei, 2021).

Osim ORAC testa u HAT testove spadaju još Test antioksidacijskog kapaciteta hidroksilnih radikala (HORAC test), Test ukupnog kapaciteta hvatanja oksiradikala (TOSC test) i Test ukupnog antioksidacijskog potencijala (TRAP test). Testovi temeljeni na prijenosu jednog elektrona, tj. *single electron transfer* (SET testovi) testovi mjere sposobnost antioksidanta da prenese elektron kako bi reducirao metalne ione, karbonilne skupine i slobodne radikale. U tu grupu spadaju: Test redukcije antioksidacijskog kapaciteta bakrenim ionom (CUPRAC test), Test redukcije antioksidacijske snage željezom (FRAP test) i Folin–Ciocalteu test. Također postoje i HAT/SET testovi koji se temelje na eliminaciji stabilnog kromofora i DPPH-a. HAT i mehanizmi prijenosa elektrona spregnutog protona igraju različite uloge u različitim omjerima. U HAT/SET testove spadaju: Trolox ekvivalentan antioksidacijski kapacitet test (TEAC test)

,1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) test i N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorid (DMPD) test radikalne neutralizacije (Munteanu i Apetrei , 2021).

FRAP test mjeri redukciju kompleksa željeznih iona (Fe^{3+}) liganda u intenzivno plavi željezni kompleks (Fe^{2+}) pomoću antioksidanta u kiselim sredinama. Apsorbancija se mjeri pri valnoj dulji od 593 nm, a rezultati testa su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}$. FRAP test se odvija pri niskom pH (3,6) jer reakcija pri niskom pH smanjuje ionizacijski potencijal koji pokreće prijenos elektrona i povećava redoks potencijal, uzrokujući pomak u dominantnom mehanizmu reakcije. FRAP test je jednostavan, brz i isplativ te ne zahtijeva specijaliziranu opremu (Munteanu, 2021). Međutim, rezultati FRAP-a mogu varirati ovisno o promatranom vremenu analize za reakciju između antioksidansa i Fe^{3+} , koje je u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati. Stoga krajnja točka apsorpcije u jednoj točki možda neće predstavljati potpunu reakciju, jer različiti antioksidanti zahtijevaju različita vremena reakcije za detekciju (Pulido i sur., 2000).

DPPH test, koji spada u temelji se na doniranju elektrona iz antioksidanta kako bi se neutralizirao DPPH radikal. Reakcija je popraćena promjenom boje DPPH mjerene na 517 nm, a diskoloracija je pokazatelj antioksidacijske aktivnosti. DPPH• nije prirodni radikal, ali je mehanizam reakcije s antioksidantima sličan onom s peroksilnim radikalima ROO•. Prednosti DPPH metode su niske cijene, jednostavnost izvođenja pokusa, ponovljivost, primjenjivost na sobnoj temperaturi i mogućnosti automatizacije (Munteanu i Apetrei, 2021).

2.5. Ultrazvuk

Ultrazvuk (UZ) se definira kao val mehaničke prirode za čije širenje je potreban elastičan medij. Zvuk i ultrazvuk razlikuju se po frekvenciji: zvučni valovi se šire na frekvencijama koje može čuti ljudsko uho (od 16 Hz do 16–20 kHz), dok se UZ valovi šire na frekvencijama većim od 20 kHz (gornja granica čujnosti za ljudsko uho) do frekvencije od 10 MHz, koja zatim prelazi u tzv. hipersonično područje. UZ val je longitudinalni val karakteriziran izmjenom ciklusa kompresije i razrjeđivanja medija u kojem se širi, što povlači za sobom varijacije u tlaku medija; energija se prenosi zbog gibanja čestica. Ovaj proces kompresije i razrjeđivanja čestica u mediju i njihovo kasnije kolapsiranje poznato je kao fenomen kavitacije, najvažnijeg učinka visokoenergetskih UZ valova (Gallo i sur., 2018). Proces kavitacije može se podijeliti u tri faze:

nukleacija, rast i kolaps mjehurića (Bendicho i Lavillo, 2000). Tijekom faze razrjeđivanja ultrazvučnog vala, mnogi sićušni mjehurići se šire kako raste pritisak na njihovu stijenku koji je veći od tlaka tekućine na udaljenosti od mjehurića. Tijekom faze kompresije ultrazvučnog vala, neki od mjehurića nasilno kolabiraju što dovodi do emitiranja udarnog vala u tekućinu (Yasui, 2018). Temperature i tlakovi postignuti unutar kavitacijskog mjehurića u vodi (temperatura i tlak vode su standardni) prije kolapsa su gotovo 4200 K i 975 bara. Kavitacija se može podijeliti u dvije klase: prijelaznaolazna i stabilna (Bendicho i Lavillo, 2000).

Ultrazvuk se primjenjuje u prehrambenim industrijama zbog svojih mehaničkih i/ili kemijskih učinaka na procese homogenizacije, miješanja, ekstrakcije, filtracije, kristalizacije, dehidracije, fermentacije, smanjenja veličine čestica, privremenih ili trajnih modifikacija viskoznosti, modulacije rasta živih stanica, destrukcije stanica i disperzije agregata, inaktivacije mikroorganizama i enzima te sterilizacije opreme (Gallo i sur., 2018).

2.6. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Različite skupine spojeva, kao što su arome, polifenoli, organske tvari i minerali, učinkovito su ekstrahirane iz raznih matrica korištenjem UZ. Mehanički učinci olakšavaju veći prodor otapala u stanice, poboljšavajući prijenos i učinak kavitacije, što uzrokuje pucanje staničnih stijenki i otpuštanje sadržaja u medij (Dolatowski i sur., 2007). Stoga se ovom tehnologijom postižu veći prinosi u kraćem vremenu uz niže temperature obrade. Štoviše, nekoliko je primjena pokazalo da ekstrakcija uz pomoć UZ predstavlja ekološku i ekonomski održivu alternativu konvencionalnim tehnikama za hranu i prirodne proizvode (Chemat i sur., 2017). Glavne prednosti su smanjenje vremena ekstrakcije i obrade, količine energije i upotrijebljenih otapala i emisije CO₂ (Gallo i sur., 2018).

Ultrazvučne ekstrakcije mogu biti provedene korištenjem ultrazvučne kupelji (indirektno) i pomoću ultrazvučne sonde (direktno), koji se temelje na piezoelektričnom pretvaraču kao izvoru ultrazvučne snage. Ultrazvučna sonda sastoji se od sonde spojene na pretvornik. Sonda je uroñjena u posudu za ekstrakciju te uslijed ultrazvučnog tretmana sondom dolazi do stvaranja ultrazvuka u medij uz minimalni gubitak energije. Sonda s manjim promjerom stvara veći učinak akustične kavitacije, ali učinak je ograničen na uže polje. Nasuprot tomu, sonde većeg

promjera imaju slabiji učinak kavitacije, ali se energija distribuira na veće područje (Kumar i sur., 2021).

Neki od faktora koji utječu na ekstrakciju potpomognutom ultrazvukom su: frekvencija, vrijeme, amplituda, primijenjeno otapalo, omjer tekućine i krutog udjela u uzorku, temperatura, pH, itd. (Kumar i sur., 2021).

2.7. Liofilizacija

Liofilizacija je proces u kojem se voda zamrzava, nakon čega slijedi njeno uklanjanje iz uzorka, prvo sublimacijom (primarno sušenje), a potom desorpcijom (sekundarno sušenje). Sušenje smrzavanjem je proces sušenja u kojem se voda sublimira iz proizvoda nakon što se zamrzne. To je proces sušenja primjenjiv u proizvodnji određenih lijekova i bioloških tvari koje su termolabilne ili na drugi način nestabilne u vodenim otopinama tijekom duljeg vremena skladištenja, ali koje su stabilne u suhom stanju. Liofilizacija je uobičajena, ali i skupa stoga je jedan od ključnih ciljeva tijekom procesa sušenja smrzavanjem minimizirati vrijeme sušenja. Liofilizacija je korištena u brojnim primjenama, najčešće u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Gaidhani i sur., 2015).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Materijali

3.1.1.Uzorak

Biljni materijal korišten u ovom istraživanju je osušena kora rajčice dobivena od projektnih partnera, industrije ASSAN FOODS. Prije daljnje obrade kore rajčice, uzorak je izmljeven, te je izvagano 2 g ($\pm 0,1$ g) uzorka u staklenoj laboratorijskoj čaši. Ukupno je ekstrahirano 12 uzoraka od čega 8 ultrazvučno, a 4 toplinski. Uzorci označeni s oznakom TU su tretirani ultrazvučnom ekstrakcijom, a uzorci označeni s T %EtOH/vrijeme tretiranja su tretirani toplinskom ekstrakcijom.

Tablica 2. Nazivi uzoraka i procesni parametri ekstrakcije

Ime uzorka	Amplituda	Vrijeme ekstrakcije	EtOH
	%	Min	%
TU1	100	9	0
TU2	75	3	0
TU3	75	9	50
TU4	100	3	50
TU5	100	3	0
TU6	75	3	50
TU7	75	9	0
TU8	100	9	50
T0/3		3	0
T50/3		3	50
T0/9		9	0
T50/9		9	50

3.1.2. Reagensi i kemikalije

1. Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)

2. 96 % Etanol koji se razrjeđuje na 50 % otopinu etanola (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: 520 mL 96 % etanola se razrijedilo dodavanjem 480 mL deionizirane vode.

3. 40 mM vodena otopina HCl-a (Carlos Erba reagents, Val-de-Reuil, Francuska)

Priprema: 330 μ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) se razrijedio u odmjernoj tikvici (100 mL) s deioniziranom vodom te se nadopunio do oznake i promiješao.

4. 0,3 M acetatni pufer (pH 3,6) ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ - GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska i octena kiselina- J.T.Baker, Gliwice, Poljska)

Priprema: 1,55 g $C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

5. 20 mM otopine $FeCl_3$ (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: 0,0278 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$ se otopi u 10 mL deionizirane vode.

6. 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija)

Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa na dan određivanja.

7. Standard željezo (II)-sulfat septahidrat ($FeSO_4 \times 7H_2O$) (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka)

Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata septahidrat ($FeSO_4 \times 7H_2O$). Odvaje se 0,139 g željezo (II)-sulfat septahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s deioniziranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 500 mL, te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

8. FRAP reagens

Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL $FeCl_3$ u omjeru 10:1:1.

9. Otopina standarda Trolox-a koncentracije 1 mM (96%-tni metanol- T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska i Trolox- ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija)

Priprema: 0,025 g Trolox-a se otapa u 100 mL 96% metanola u odmjernoj tikvici.

10. Otopina DPPH-a (ABCR, Karlsruhe, Njemačka)

Priprema: Otopi se 7,41 mg 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u 96% metanolu u odmjernoj tikvici od 200 mL koja se zatim napuni do oznake.

3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Uređaji:

- Sjeckalica za povrće
- Tehnička vaga The Highland HCB 1002 (Adam Equipment, Milton Keynes, UK)
- Ultrazvučni aparat Q700CA Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
- Vakuum pumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- Liofilizator TF-10D (TEFIC BIOTECH CO., LIMITED, Xi'an, Kina)
- Vortex uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
- pH metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska) HI5522
- UV-VIS Spektrofotometar UV-2600i s opcijском ISR2600Plus s integrirajućom sferom (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Pribor: -Čaše od 10, 100 i 250 ml

- Odmjerne tikvice od 10,100 i 200 ml
- Stakleni lijevak
- Epruvete
- Menzure
- Odsisna boca
- Kapaljke
- Büchnerov lijevak
- „Falkonice“
- „Epice“
- Ladice za vaganje uzorka
- Kivete
- Metalne špatulice
- Metalne žlice
- Aluminijska folija
- Filter papir
- Pipetman

3.2. Metode

3.2.1. *Ultrazvučna ekstrakcija*

U laboratorijsku čašu s uzorkom dodano je 100 ml ekstrakcijskih otapala: u 6 laboratorijskih čaša s uzorkom dodana je 50 % otopina etanola i u drugih 6 laboratorijskih čaša deionizirana voda. Za ultrazvučnu ekstrakciju korišten je uređaj Ultrazvučni aparat- SONICATOR Q700 uz sljedeće parametre: dvije amplitude (75 i 100 %), te vrijeme od 3 i 9 minuta. Uređaj se sastoji od izolacijskog kućišta u kojemu se nalaze sonda i termočlanak, te sučelja na dodir na kojemu se postavljaju parametri ekstrakcije. Čaše sa uzorkom i ekstrakcijskim otapalom stavljane su u uređaj, tako da je ultrazvučna sonda promjera 12 mm uronjena u centar laboratorijske čaše s uzorkom i otapalom, te je namještena na način da bude uronjena barem za 2 puta promjera sonde (u našem slučaju barem 2,4 cm), a da pritom ne dodiruje stijenke laboratorijske čaše. Čaše s uzorcima uronjene su u led, kako ne bi došlo do stvaranja previsoke temperature u uzorku tijekom provođenja ekstrakcije (tijekom implozije mjehurića lokalizirano nastaju vrlo visoke temperature). U uzorak, je također uronjen termočlanak kako bi se zabilježila temperatura uzoraka prije i nakon provođenja ekstrakcije, te se zatvaraju vratašca ultrazvuka i ekstrakcija se započinje. Ukupno je ekstrahirano 8 uzoraka. Odmah nakon završetka ekstrakcije, uzorak je filtriran koristeći Büchnerov lijevak i vakuum pumpu.



Slika 3. Ultrazvučni aparat Q700CA Sonicator (vlastita fotografija)

3.2.2. *Toplinska ekstrakcija*

Toplinska ekstrakcija je konvencionalna metoda s kojom uspoređujemo ultrazvučnu ekstrakciju. Uzorci se kod toplinske ekstrakcije pripremaju na isti način kao i za ultrazvučnu ekstrakciju. Ekstrahirana su 4 uzorka (2 sa 0 % etanola i 2 s 50 % etanola). Za provođenje toplinske ekstrakcije koristi se Ultrazvučna kupelj DT 100 H i ekstrakcije se provode na temperaturi od 60 °C. Mogućnost soniciranja je isključena te se kupelj koristi isključivo za zagrijavanje uzoraka. Varijabilni parametar je vrijeme ekstrakcije: trajanje 3 i 9 minuta. Nakon ekstrakcije, uzorke je potrebno filtrirati na isti način kao i kod ultrazvučne ekstrakcije.

3.2.3. Mjerenje pH i električne provodljivosti

Nakon provedenih ekstrakcija i filtracija, uzorcima je izmjerena pH i električna vodljivosti. Za taj proces korišten je uređaj pH-EC metar HI5521-02. pH je mjerena uranjanjem staklene pH elektrode u uzorak, a električna vodljivost uranjanjem elektrode za određivanje električne vodljivosti. Nakon svakog uzorka elektrode su isprane s deioniziranom vodom.

3.2.4. Liofilizacija

Liofilizacija se provodi pomoću uređaja Liofilizator TF-10D u trajanju od 48 sati. Liofilizirani su uzorci koji sadrže 0 % etanola jer se uzorci s 50 % etanola (ledište 50 % otopine etanola je -32 °C) ne mogu u potpunosti zamrznuti pri temperaturama skladištenja uzoraka u zamrzivaču (-20 °C), a uzorci su trebali biti smrznuti za provođenje liofilizacije. Liofilizacija se provodi pri tlakovima nižim od 100 Pa i temperaturama nižim od -40 °C.

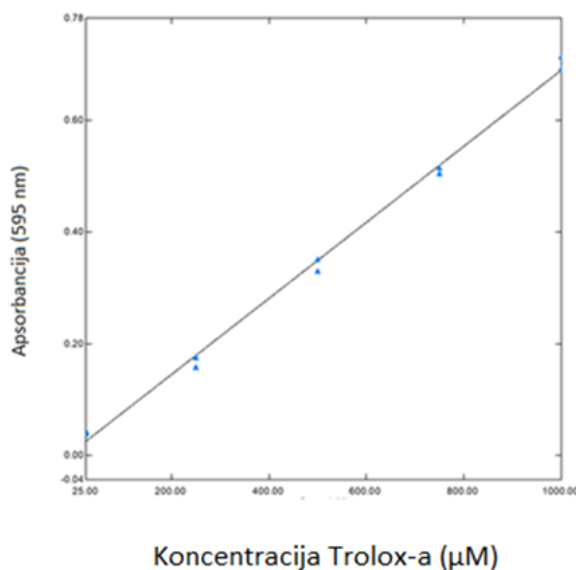
3.2.5. FRAP metoda

FRAP metoda je metoda kojom se mjeri redukcija kompleksa željeznih iona (Fe^{3+}) liganda u intenzivno plavi željezni kompleks (Fe^{2+}) pomoću antioksidansa u kiselim sredinama. Antioksidacijska aktivnost određena je povećanjem apsorbancije na 593 nm, a rezultati su izraženi kao mikromolarni ekvivalenti Fe^{2+} . FRAP metoda se provodi u kiselim pH uvjetima (pH = 3,6) kako bi se održala topljivost željeza. Reakcija pri niskom pH smanjuje ionizacijski potencijal

koji pokreće prijenos elektrona i povećava redoks potencijal, uzrokujući pomak u dominantnom mehanizmu reakcije. TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) se koristi kao ligand koji reagira sa željezovim ionima (Munteanu i Apetrei, 2021).

Postupak izrade baždarnog dijagrama

Pripremljeno je 100 mL 1 mM otopine $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ iz kojih su pripremljena razrjeđenja od 25, 250, 500, 750 i 1000 μM u odmjernim tikvicama od 10 mL. Zatim se u epruvete od 10 mL otpipetira 240 μL deionizirane vode, 80 μL otopine standarda i 2080 μL FRAP reagensa. Otopine se vorteksiraju pomoću uređaja Vortex uređaj MX-S, te se griju u kupelji na temperaturama od 40 °C, 5 minuta. Apsorbancija se mjeri pomoću UV-VIS Spektrofotometra UV-2600i pri valnoj duljini od 595 nm. Iz dobivenih rezultata, u programu Microsoft Office Excel izrađen je dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a u uzorku

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti nepoznatih uzoraka FRAP metodom

U epruvete se redom dodaje 240 μL deionizirane vode, 80 μL uzorka nepoznate koncentracije i 2080 μL FRAP reagensa. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka te se umjesto uzorka stavlja ekstrakcijsko otapalo. Epruvete se vorteksiraju i griju u kupelji (Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem) pri temperaturi od 40 °C u vremenu od 5 minuta. Uzorcima se mjeri apsorbancija pri 595 nm i za svaki uzorak se apsorbancija mjeri u paralelama. Iz napravljenog baždarnog

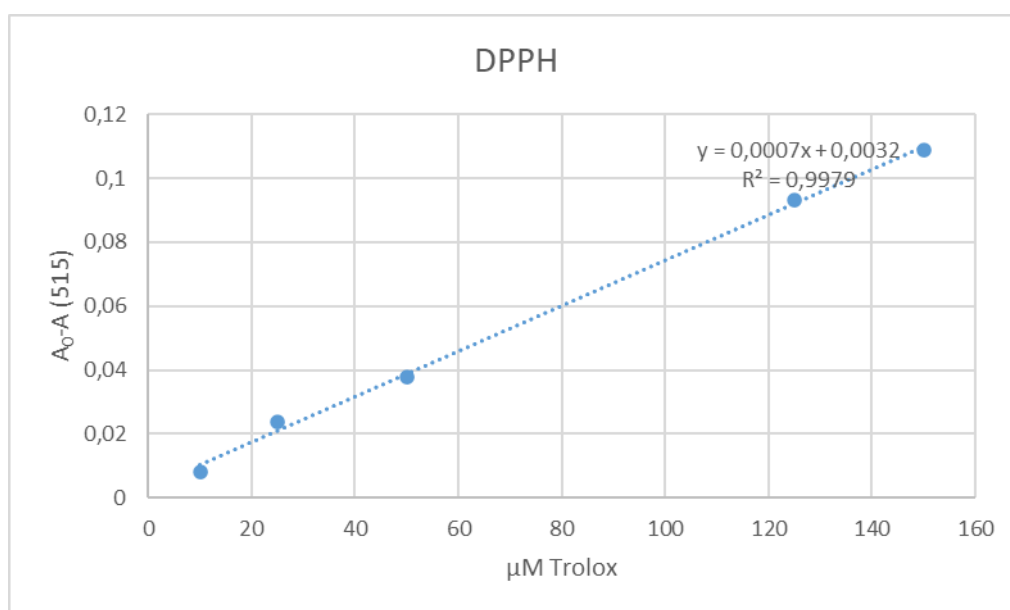
dijagrama i izmjerenih apsorbancija, određuje se koncentracija nepoznatog uzorka izražena kao ekvivalent Fe^{2+} ($\mu\text{mol/L}$).

3.2.6. DPPH metoda

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda temelji se na doniranju elektrona iz antioksidansa kako bi se neutralizirao DPPH radikal. Reakcija je popraćena promjenom boje DPPH-a mjerene na 517 nm, a diskoloracija je pokazatelj antioksidacijskog djelovanja (Munteanu i Apetrei, 2021).

Postupak izrade baždarnog dijagrama

Trolox otopina koncentracije 1 mM se prenijela u odmjernu tikvicu od 10 mL i izrađena su razrjeđenja od 10 μM , 25 μM , 50 μM , 125 μM i 150 μM . U epruvete je otpipetirano 100 μL razrjeđenja standardnih otopina Trolox-a i 3,9 mL 0,0094 mM otopine DPPH. Epruvete su se vorteksirale i ostavljene su na mračno mjesto na 30 minuta kako bi se reakcija mogla provesti. Zatim se mjerila apsorbancija otopina pri valnoj dulji pri 515 nm pomoću Spektrofotometra UV-2600i. Iz dobivenih rezultata, u Microsoft Office Excel programu izrađen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti nepoznatih uzoraka

U epruvete se dodaje 100 µL uzorka i 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. U slijepu probu umjesto uzorka dodaje se isti volumen 96% metanola. Epruvete se vorteksiraju i ostavljene su na mračnom mjestu na 30 minuta kako bi se mogla provesti reakcija. Nakon završene reakcije, mjeri se apsorbancija uzoraka pri 515 nm. Za svaki uzorak apsorbancija se mjeri u paralelama. Iz dobivenih rezultata i izrađenog baždarnog dijagrama, određuje se koncentracija uzoraka izražena kao ekvivalent Trolox-a (µM).

3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase

Rezultate FRAP i DPPH metode potrebno je izraziti kao µmol Trolox/g suhe tvari. Za to je potrebno odrediti udio suhe tvari u uzorku korištenjem metode sušenja do konstantne mase. Staklene posude stavljene su u testnu (klima) komoru na 105 °C. Nakon sušenja, posude su ohlađene u eksikatoru u vremenu od 20 minuta, te su vagane na analitičkoj vagi s točnošću od ± 0,0002g. Zatim, u posude je dodano 2,5 g uzorka koji se su onda sušili u testnoj (klima) komori (105 °C ± 0,5 °C) sat vremena. Nakon sušenja, posude s uzorcima hlade se u eksikatoru, te su zatim bile vagane. Postupak sušenja i hlađenja uzoraka se ponavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Iz dolje navedene formule se izračunao udio suhe tvari, što je u ovom slučaju 94,39%.

$$\text{Suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 – masa prazne posudice

m_1 – masa posudice s uzorkom prije sušenja

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja

3.2.8. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađivani su u programu STATGRAPHICS Centurion. Za statističku obradu korištena je Multivarijantna analiza varijance (eng. *Multivariate analysis of variance*, MANOVA) sa značajnom razlikom na razini $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj provođenja eksperimentalnog dijela je usporedba utjecaja ultrazvuka visoke snage na ekstrakciju antioksidacijskih komponenti iz suhe kore rajčice u odnosu na konvencionalnu toplinsku metodu ekstrakcije pri 60 °C. Nezavisne varijable ultrazvučne ekstrakcije su amplituda (75 % i 100 %), vrijeme (3 i 9 minuta) i udio etanola u uzorku (0 % i 50 %), a nezavisne varijable toplinske metode su vrijeme tretiranja (3 i 9 minuta) i udio etanola (0 % i 50 %). Zavisna varijabla je antioksidacijska aktivnost u suhoj kori rajčice izražena kao $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari kore rajčice. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određuje se DPPH i FRAP metodama, i prije i nakon liofilizacije (liofilizirani su samo uzorci koji imaju deioniziranu vodu kao ekstrakcijsko otapalo). Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti za ultrazvučnu ekstrakciju, pH vrijednosti i vrijednosti električne vodljivosti obrađeni su u programu STATGRAPHICS Centurion.

4.1. Rezultati

4.1.1. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka

Tablica 3. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka - prije liofilizacije

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min)	Udio etanola (%)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) DPPH metoda
TU1	100	9	0	$21,77 \pm 0,14$	$5,65 \pm 0,08$
TU2	75	3	0	$18,62 \pm 1,03$	$4,02 \pm 0,29$
TU3	75	9	50	$23,38 \pm 0,49$	$7,01 \pm 0,21$
TU4	100	3	50	$14,60 \pm 0,33$	$5,71 \pm 0,23$
TU5	100	3	0	$17,10 \pm 0,33$	$3,99 \pm 0,29$
TU6	75	3	50	$13,95 \pm 0,06$	$5,68 \pm 0,59$
TU7	75	9	0	$20,94 \pm 0,45$	$1,77 \pm 0,03$
TU8	100	9	50	$39,45 \pm 3,62$	$5,30 \pm 0,32$

Iz tablice 3. je vidljivo da najveće vrijednosti imaju uzorci TU8 ($39,45 \pm 3,62$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) za FRAP metodu i uzorak TU3 ($7,01 \pm 0,21$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) za DPPH metodu. Uzorak TU8 je tretiran pri amplitudi od 100 % u vremenu od 9 minuta, te je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 50 %-tni etanol. Uzorak TU3 je tretiran pri amplitudi od 75 % u vremenu od 9 minuta, te je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 50 %-tni etanol. Najmanje vrijednosti su imali uzorci TU6 za FRAP metodu ($13,95 \pm 0,06$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) i TU7 za DPPH metodu ($1,77 \pm 0,03$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari). Vrijednost TU7 uzorka je značajno manja od vrijednosti ostalih uzoraka za DPPH metodu, te je moguće da je došlo do greške pri pripremi uzorka što bi utjecalo na rezultate. Moguće je da uzorak nije pravilno filtriran ili da uzorak nije ispravno homogeniziran. Parametri ultrazvučne ekstrakcije za uzorak TU6 su : amplituda 75 %, vrijeme tretiranja 3 minute te ekstrakcijsko otapalo 50 %-tni etanol. Parametri uzorka TU7 su : amplituda 75 %, vrijeme tretiranja 9 minuta i korištenje deionizirane vode kao ekstrakcijskog otapala. Promatrajući pojedinačni utjecaj parametara na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka, kao i njihove međusobne utjecaje, vidljivo je da su vrijeme tretiranja i odabir ekstrakcijskog otapala imali značajniji utjecaj na rezultate u odnosu na amplitudu. Tako npr., uspoređujući vrijednosti uzoraka TU2 (amplituda 75 %, vrijeme tretiranja 3 minute i deionizirana voda kao ekstrakcijsko otapalo) i TU8 (amplituda 100 %, vrijeme tretiranja 9 minuta i 50 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo), vidljivo je da uzorak TU8 ima vrijednost antioksidacijske aktivnosti preko 2 puta veću u odnosu na uzorak TU2 za FRAP metodu. Dakle, može se zaključiti da povećanjem vremena tretiranja uzoraka i korištenjem 50 %-tnog etanola u odnosu na deioniziranu vodu dolazi do povećanja vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. U teoriji, ekstrakti dobiveni s otapalima visoke polarnosti pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost (Herrera-Pool i sur., 2021).

Također, Muñiz-Márquez i sur. (2013) su zaključili da su posebno mješavine vode i alkohola učinkovitije u izdvajanju fenolnih spojeva. Visoka koncentracija etanola može uzrokovati denaturaciju proteina, sprječavajući otapanje polifenola i zatim utjecati na ekstrakciju.

Palma i sur. (2021) su zaključili da je s povećanjem vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka,

dokazan veći kapacitet ekstrakcije za sve komponente. To se može objasniti činjenicom da je prijenos mase vremenski ovisan proces. No, vrijeme ekstrakcije ne smije biti predugo jer može doći do degradacije bioaktivnih komponenti, čime se smanjuje uspješnost ekstrakcije.

Tablica 4. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama za ultrazvučno tretirane uzorke - nakon liofilizacije

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min.)	Udio e-tanola (%)	Antioksidacijska aktivnost (μmol Trolox/g suhe tvari) FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost (μmol Trolox/g suhe tvari) DPPH metoda
TU1	100	9	0	$17,31 \pm 0,26$	$2,44 \pm 0,00$
TU2	75	3	0	$20,93 \pm 0,06$	$5,83 \pm 0,13$
TU5	100	3	0	$21,69 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,20$
TU7	75	9	0	$20,92 \pm 0,46$	$3,03 \pm 0,25$

Kod liofiliziranih uzoraka (liofilizirani su samo uzorci s deioniziranom vodom kao ekstrakcijsko otapalo), najveće vrijednosti imaju uzorci TU5 ($21,69 \pm 0,3 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari) koji je tretiran 3 minute pri amplitudi od 100 % za FRAP metodu i TU2 ($5,83 \pm 0,13 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari) koji je tretiran 3 minute pri amplitudi od 75 % za DPPH metodu. Najmanju vrijednost ima uzorak TU1 ($17,31 \pm 0,26 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari za FRAP metodu i $2,44 \pm 0,00 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari za DPPH metodu) koji je tretiran 9 minuta pri amplitudi od 100 %. Promatrajući parametre amplitude i vremena tretiranja uzoraka, vidljivo je da amplituda nije imala značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost, a da je vrijeme tretiranja imalo utjecaj. Uzorci koji su tretirani 3 minute imali su veću antioksidacijsku vrijednost u odnosu na uzorke koji su tretirani 9 minuta. Uspoređujući vrijednosti antioksidacijske aktivnosti neliofiliziranih i liofiliziranih uzoraka, vidljivo je da nema nikakvog linearnog porasta ili pada vrijednosti, tj. vrijednost nekih uzoraka se nakon liofilizacije povećala, dok je kod nekih pala. Znatno je spomenuti da je optimalno vrijeme tretiranja prije liofilizacije 9 minuta, a nakon liofilizacije 3 minute.

Santos Souza i sur. (2014) su u istraživanju efekta liofilizacije na antioksidacijsku aktivnost avokada (*Persea americana* Mill.) zaključili da liofilizacijom, antioksidacijska aktivnost pada. To nije u potpunosti u skladu s našim rezultatima.

4.2. Statistička obrada podataka

4.2.1. Statistička obrada rezultata antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom

Tablica 5. Statistička značajnost varijabli za FRAP metodu

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-Om- jer	p-Vrijedn- ost
A:Amplituda	32,1145	1	32,1145	1,51	0,4354
B:Vrijeme tretiranja	212,72	1	212,72	9,97	0,1953
C:%EtOH	20,9609	1	20,9609	0,98	0,5028
AB	39,4881	1	39,4881	1,85	0,4035
AC	37,9029	1	37,9029	1,78	0,4098
BC	93,0882	1	93,0882	4,36	0,2843
Ukupna pogreška	21,3381	1	21,3381		
Ukupna (ispravljeno)	457,613	7			

R-kvadrat = **95,3371%**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode)= **67,3596%**

Standardna pogreška (procjena)= **4,61932**

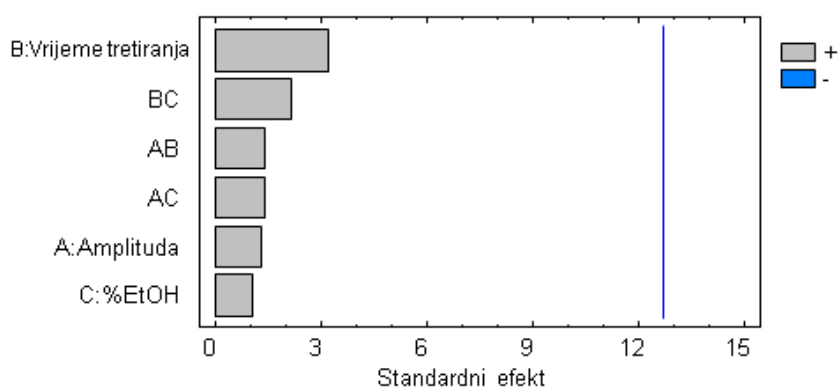
Srednja apsolutna greška = **1,63317**

Durbin-Watson statistika = 2,5

Lag 1 residualna autokorelacija= -0,375

U Tablici 5., ANOVA prikazana je varijabilnost antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom, te je podijeljena u zasebne dijelove za svaki učinak. Zatim testirane su statističke značajnosti svakog učinka usporedbom srednjeg kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 0 varijabli je imalo P-vrijednosti manju od 0,05, što ukazuje da se značajno

razlikuju od nule na razini pouzdanosti od 95,0%. R-kvadrat statistika pokazuje da model objašnjava 95,3371% varijabilnosti antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom. Prilagođena R-kvadrat statistika, koja je prikladnija za usporedbu modela s različitim brojem nezavisnih varijabli, iznosi 67,3596%. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija reziduala 4,61932. Srednja apsolutna pogreška od 1,63317 je prosječna vrijednost reziduala. Durbin-Watson (DW) statistika testira ostatke kako bi utvrdila postoji li značajna korelacija na temelju redoslijeda eksperimenta.



Slika 6. Pareto graf antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom

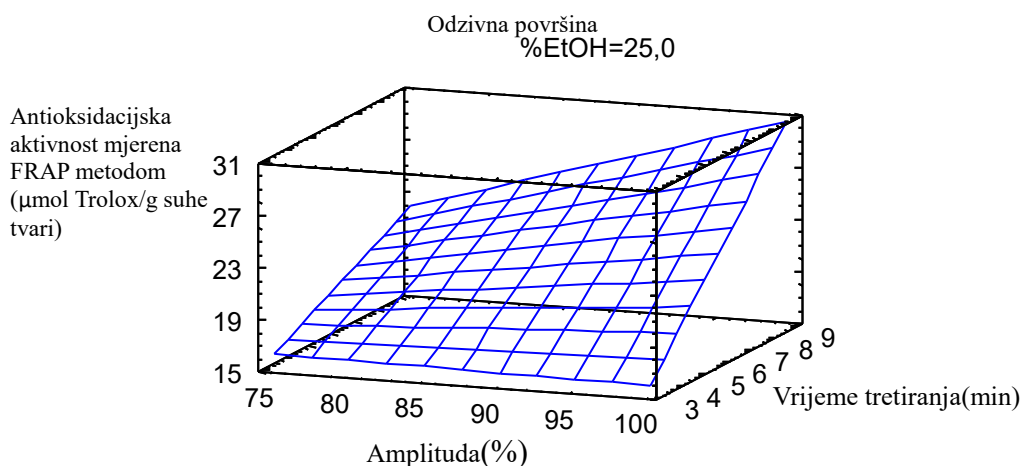
Pareto graf (Slika 6.) je vizualni prikaz statistički značajnih vrijednosti. Vrijednosti koje se nalaze desno od plave vertikalne linije su statistički značajne, a vrijednosti koje se nalaze lijevo od linije nisu statistički značajne. U ovom slučaju, nijedna vrijednost nije statistički značajna.

Tablica 6. Optimizacija antioksidacijske aktivnosti

Polinom optimizacije	Optimalna vrijednost			
Antioksidacijska aktivnost= 48,4327 - 0,369321*Amplituda - 4,6022*Vrijeme tretiranja - 0,817611*%EtOH + 0,0592457*Amplituda*Vrijeme tretiranja + 0,00696532*Amplituda*%EtOH + 0,0454822*Vrijeme tretiranja*%EtOH	Faktor	Najniži	Najviši	Optimalan
	Amplituda	75,0	100,0	100,0
	Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
	%EtOH	0,0	50,0	50,0
	Antioksidacijska aktivnost= 37,82 μ mol Trolox/g suhe tvari			

Optimalna antioksidacijska vrijednost (Tablica 6.) dobivena statističkom analizom je bila 37,82 mg/g suhe tvari. Optimalna amplituda je bila 100 %, optimalno vrijeme tretiranja je bilo 9

minuta i optimalni udio etanola je bio 50 %. Optimizacija se provodi s ciljem dobivanja što veće antioksidacijske aktivnosti, no nijedan od faktora nema statističku značajnosti što znači da se ne moraju podešavati na optimalnu vrijednost kako bi se dobila optimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti.



Slika 7. Dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost mjerene FRAP metodom

Iz dijagrama odzivne površine (Slika 7.), vidljivo je da je antioksidacijska aktivnost najveća pri tretiranju uzorka 9 minuta pri amplitudi od 100 %. Antioksidacijska aktivnost je najmanja pri tretiranju uzorka 3 minute pri amplitudi od 100 %. Udio etanola (25 %) na dijagramu je fiksni parametar.

4.2.2. Statistička obrada rezultata antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom

Tablica 7. Statistička značajnost varijabli za DPPH metodu

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	p-Vrijednost
A:Amplituda	0,586642	1	0,586642	0,15	0,7664
B:Vrijeme tretiranja	0,0150239	1	0,0150239	0,00	0,9609
C:%EtOH	8,55044	1	8,55044	2,15	0,3808
AB	0,590137	1	0,590137	0,15	0,7658
AC	3,8192	1	3,8192	0,96	0,5062

BC	0,285773	1	0,285773	0,07	0,8332
Ukupna pogreška	3,97165	1	3,97165		
Ukupna (ispravljenno)	17,8189	7			

R-kvadrat = **77,7111%**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode)= **0,00%**

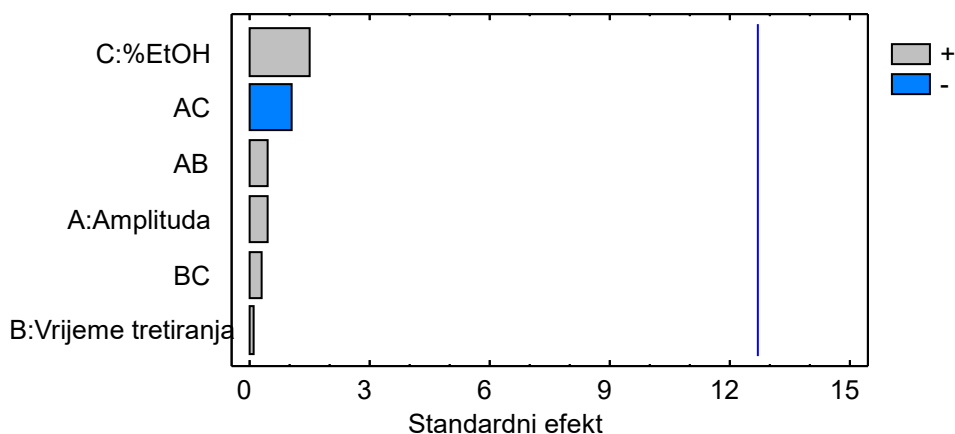
Standardna pogreška (procjena)= **1,9929**

Srednja apsolutna greška = **0,704597**

Durbin-Watson statistika = 2,5

Lag 1 residualna autokorelacija= -0,375

Iz tablice 7. je vidljivo da nijedna varijabla nije imala P-vrijednosti manju od 0,05, što ukazuje da se značajno razlikuju od nule na razini pouzdanosti od 95,0 %. R-kvadrat statistika pokazuje da model objašnjava 77,711 % varijabilnosti antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom. Prilagođena R-kvadrat statistika, koja je prikladnija za usporedbu modela s različitim brojem nezavisnih varijabli, iznosi 0,0 %. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija reziduala 1,9929. Srednja apsolutna pogreška od 0,704597 je prosječna vrijednost reziduala.



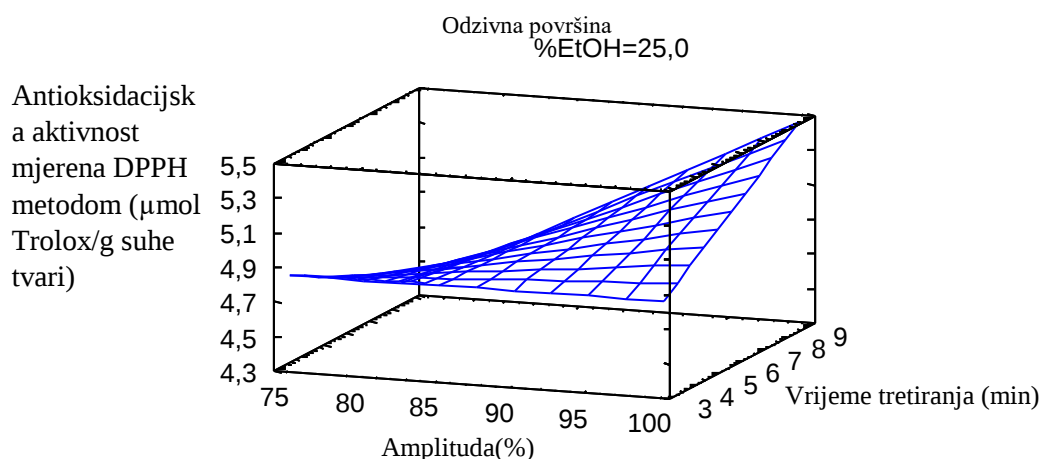
Slika 8. Pareto graf antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom

Vrijednosti koje se nalaze desno od plave vertikalne linije na Paretovom grafu su statistički značajne, a vrijednosti koje se nalaze lijevo od linije nisu statistički značajne. U ovom slučaju, nijedna vrijednost nije statistički značajna. (Slika 8.)

Tablica 8. Optimizacija antioksidacijske aktivnosti

Polinom optimizacije	Optimalna vrijednost			
$\text{Antioksidacijska aktivnost} = 1,21821 + 0,0334828 \cdot \text{Amplituda} - 0,682291 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,219697 \cdot \% \text{EtOH} + 0,00724269 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme tretiranja} - 0,00221101 \cdot \text{Amplituda} \cdot \% \text{EtOH} + 0,00252002 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \% \text{EtOH}$	<i>Faktor</i>	<i>Naj-niži</i>	<i>Najviši</i>	<i>Optimalno</i>
	Amplituda	75,0	100,0	75,0
	Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0
	%EtOH	0,0	50,0	50,0
$\text{Antioksidacijska aktivnost} = 6,38369 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$				

Iz tablice 8. vidljivo je da je optimalna antioksidacijska vrijednost mjerena DPPH metodom 6,38369 mg/g suhe tvari. Optimalna vrijednost se dobije pri amplitudi od 75 %, vremenu tretiranja 3 minute i udjelom etanola kao ekstrakcijsko otapalo 50 %. Optimizacija se provodi s ciljem dobivanja što veće antioksidacijske aktivnosti, no nijedan od faktora nema statističku značajnosti što znači da se ne moraju podešavati na optimalnu vrijednost kako bi se dobila optimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti.



Slika 9. Dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost mjerene DPPH metodom. Iz dijagrama odzivne površine (Slika 9.) je vidljivo da je antioksidacijska aktivnost najveća pri tretiranju uzorka 9 minuta pri amplitudi od 100 %. Udio etanola (25 %) na dijagramu je fiksni parametar.

4.1.2. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod toplinski tretiranih uzoraka

Tablica 9. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod toplinski tretiranih uzoraka- prije liofilizacije

Uzorak	Vrijeme (min)	Udio etanola (%)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$) FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$) DPPH metoda
T0/3	3	0	$22,47 \pm 0,41$	$6,40 \pm 0,05$
T50/3	3	50	$30,88 \pm 0,11$	$6,27 \pm 0,49$
T0/9	9	0	$21,91 \pm 0,23$	$5,80 \pm 0,12$
T50/9	9	50	$29,94 \pm 0,25$	$8,51 \pm 0,72$

Toplinska ekstrakcija provodi se pri temperaturi od 60 °C. Temperature iznad 70 °C mogu uzrokovati degradaciju termolabilnih spojeva kao što su neki flavonoidi (Palma i sur., 2021). Najveću antioksidacijsku aktivnost su imali uzorci T50/3 ($30,88 \pm 0,11 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$) tretiran 3 minute i ekstrakcijsko otapalo 50 %-tni etanol (za FRAP metodu) i T50/9 ($8,51 \pm 0,72 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$) tretiran 9 minuta, i ekstrakcijsko otapalo 50 %-tni etanol. Najmanju vrijednost ima uzorak T0/9 ($21,91 \pm 0,23 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$ za FRAP metodu i $5,80 \pm 0,12 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$ za DPPH metodu) tretiran 9 minuta te ekstrakcijsko otapalo deionizirana voda. Iz rezultata FRAP metode za konvencionalnu metodu ekstrakcije, vidljivo je da su udio etanola i vrijeme tretiranja utjecali na antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijska aktivnost je veća kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi 50 %-tni etanol i kada je vrijeme tretiranja uzoraka 3 minute. Udio etanola ima značajniji veći utjecaj na antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vrijeme tretiranja. Važno je napomenuti kako se za toplinsku metodu ekstrakcije, koristio manji broj uzoraka, te se zbog tog razloga nije provela statistička analiza u programu STATGRAPHICS Centurion.

Uspoređujući rezultate ultrazvučne ekstrakcije (Tablica 3.) i toplinske ekstrakcije (Tablica 5.), vidljivo je da su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti slične kod ultrazvučne i toplinske metode ekstrakcije. Kao što je već navedeno, raspon vrijednosti za ultrazvučnu ekstrakciju je od $13,95 \pm 0,06$ do $39,45 \pm 3,62 \mu\text{mol Trolox/g suhe tvari}$. Raspon toplinske ekstrakcije je

21,91±0,23 - 29,94±0,25 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari. Najveći utjecaj na antioksidacijsku aktivnost kod ultrazvučne metode ima vrijeme tretiranja (optimalno: 9 minuta), a kod toplinske metode udio etanola (optimalno: 50 %-tni etanol). U teoriji, rezultati ultrazvučne ekstrakcije bi trebali biti veći u odnosu na rezultate toplinske ekstrakcije jer se tehnologijom ultrazvuka može povećati ekstrakcija komponenti kao što su polifenoli i antocijani. Pri nižim frekvencijama dominira fenomen kavitacije, koji uzrokuje mikrorupture staničnog materijala, tj. stjenki, tako omogućivši prodiranje otapala u biomaterijal i povećavajući prijenos mase (Drmić i Režek Jambrak, 2010).. Iako je najveća vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom, kod uzorka TU8 (39,45±3,62 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) tretiran ultrazvučnom ekstrakcijom, sveukupno, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti toplinske ekstrakcije su vrlo slične vrijednostima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom. Promatrajući vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom, za toplinsku metodu ekstrakcije, ne može se zaključiti korelacija između nezavisnih varijabli (vrijeme tretiranja i udio etanola) i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 10. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama kod toplinski tretiranih uzoraka- nakon liofilizacije

Uzorak	Vrijeme (min.)	Udio etanola (%)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari) DPPH metoda
T0/3	3	0	25,56 ± 2,93	5,44 ± 0,08
T0/9	9	0	25,34 ± 1,08	5,98 ± 0,19

Nakon liofilizacije, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti su povećane i rezultati su slične vrijednosti (25,56±2,93 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari za uzorak T0/3 i 25,34±1,08 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari za uzorak T0/9). Nakon liofilizacije, uzorak koji je tretiran 3 minute ima veću antioksidacijsku aktivnost.

Nakon liofilizacije, rezultati su slične vrijednosti (5,44±0,08 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari za uzorak T0/3 i 5,98±0,19 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suhe tvari za uzorak T0/9). Važno je napomenuti kako se za toplinsku metodu mjerio malen broj uzoraka, te se zbog tog razloga nije provela statistička analiza u programu STATGRAPHICS Centurion.

4.1.3. Rezultati mjerenja pH i električne vodljivosti uzoraka

Tablica 11. Rezultati mjerenja pH i električne vodljivosti uzoraka

Uzorak	pH	El. vodljivost (mS/cm)
TU1	3,96±0,00	3,34±0,01
TU2	4,01±0,00	3,01±0,00
TU3	4,68±0,01	0,92±0,00
TU4	4,69±0,01	0,80±0,00
TU5	4,02±0,02	2,86±0,00
TU6	4,64±0,01	0,80±0,01
TU7	4,03±0,02	3,24±0,00
TU8	4,66±0,01	0,90±0,00
T0/3	3,96±0,02	3,29±0,01
T0/9	3,96±0,00	3,12±0,01
T50/3	4,46±0,03	1,14±0,01
T50/9	4,49±0,02	1,13±0,00

Iz tablice 11. može se uočiti da uzorci koji su imaju 50%-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo imaju veći pH, no znatno manju električnu vodljivost. Najveći pH ima uzorak TU4 (4,69±0,01) koji je tretiran na amplitudi od 100 % u vremenu od 3 minute te kao ekstrakcijsko otapalo je korišten 50 %-tni etanol.. Najveću električnu provodljivost ima uzorak TU1 (3,34±0,01 mS/cm) tretiran pri amplitudi od 100 % u vremenu od 9 minuta te je kao ekstrakcijsko otapalo korištena deionizirana voda.

4.2.3. Statistička obrada pH vrijednosti ultrazvučno tretiranih uzoraka

Tablica 12. Statistička značajnost varijabli za pH vrijednost

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	p-Vrijednost
A:Amplituda	0,0000945313	1	0,0000945313	1,26	0,4633
B:Vrijeme tretiranja	0,000175781	1	0,000175781	2,34	0,3684

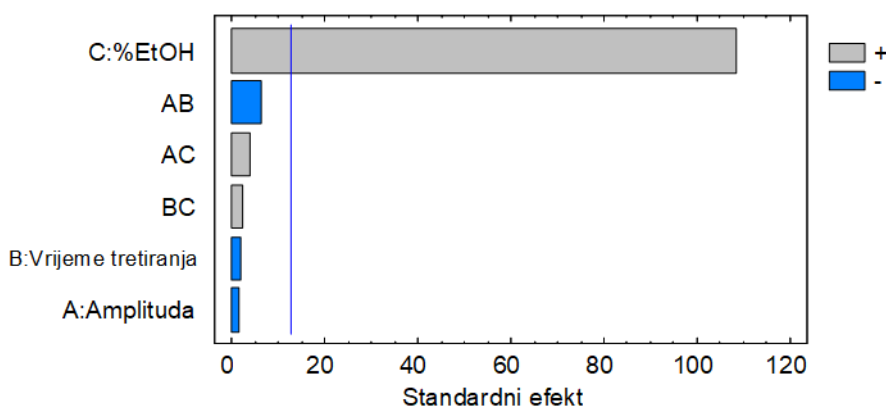
C:%EtOH	0,874173	1	0,874173	11650,78	0,0059
AB	0,00268278	1	0,00268278	35,76	0,1055
AC	0,000957031	1	0,000957031	12,76	0,1738
BC	0,000282031	1	0,000282031	3,76	0,3032
Ukupna pogreška	0,0000750313	1	0,0000750313		
Ukupna (ispravljeno)	0,87844	7			

R-kvadrat = **99,9915 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode)= **99,9402 %**

Standardna pogreška (procjena)= **0,00866206**

Srednja apsolutna greška = **0,0030625**



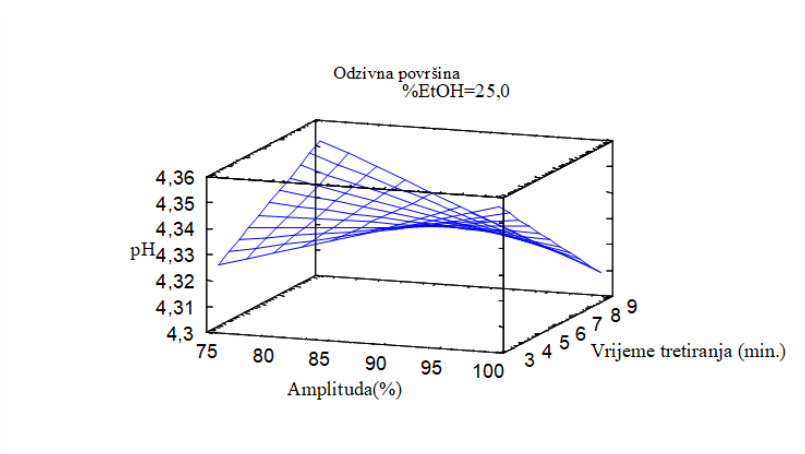
Slika 10. Pareto graf za pH vrijednost

Iz tablice 12. vidljivo je da je samo jedna vrijednost statistički značajna i to je udio etanola u uzorku, P-vrijednost od 0,0059. To se također može vidjeti na Paretovom grafu (Slika 10.) gdje se samo koncentracija etanola nalazi desno od plave linije. Iz toga se može zaključiti kako udio etanola utječe na pH uzoraka, dok ostali parametri (amplituda i vrijeme tretiranja uzorka) ne utječu. Stoga je potrebno obratiti pažnju na udio etanola prilikom optimiranja parametara kako bi se dobila optimalna pH vrijednost.

Tablica 13. Optimizacija pH vrijednosti

Polinom optimizacije	Optimalna vrijednost			
$\text{pH} = 3,87088 + 0,00178 * \text{Amplituda} + 0,0391875 * \text{Vrijeme tretiranja} + 0,009685 * \% \text{EtOH} - 0,000488333 * \text{Amplituda} * \text{Vrijeme tretiranja} + 0,000035 * \text{Amplituda} * \% \text{EtOH} + 0,0000791667 * \text{Vrijeme tretiranja} * \% \text{EtOH}$	<i>Faktor</i>	<i>Naj-niži</i>	<i>Najviši</i>	<i>Optimalno</i>
	Amplituda	75,0	100,0	100,0
	Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0
	%EtOH	0,0	50,0	50,0
pH=4,69106				

Iz tablice 13. je vidljivo da su optimalne vrijednosti parametara za dobivanje optimalne pH bile: amplituda 100 %, tretiranje uzorka 3 minute i 50 %-tni udio etanola u uzorku. Optimalna pH vrijednost je bila 4,69106. Amplituda i vrijeme tretiranja nisu statistički značajne vrijednosti, nije potrebno koristiti njihove maksimalne vrijednosti prilikom izvođenja eksperimenta.



Slika 11. Dijagram odzivne površine za pH vrijednost

Iz dijagrama odzivne površine (Slika 11.) vidljivo je da je najveća pH vrijednosti pri amplitudi od 100 % i vremenu tretiranja od 3 minute. Najmanja pH vrijednost je kod tretmana pri amplitudi od 100 % i vrijeme tretiranja 9 minuta. Udio etanola (25 %) na dijagramu je fiksni parametar.

4.2.4. Statistička obrada električne vodljivosti

Tablica 14. Statistička značajnost varijabli za električnu vodljivost

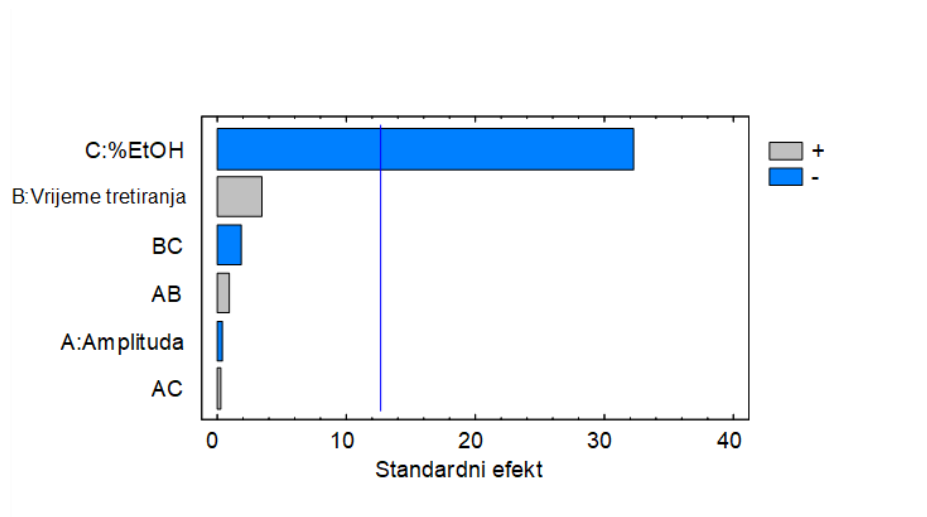
Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	p-Vrijednost
A:Amplituda	0,000442531	1	0,000442531	0,04	0,8674
B:Vrijeme tretiranja	0,109395	1	0,109395	11,04	0,1861
C:%EtOH	10,2163	1	10,2163	1031,40	0,0198
AB	0,00711028	1	0,00711028	0,72	0,5525
AC	0,000087781	1	0,000087781	0,01	0,9402
	3		3		
BC	0,030814	1	0,030814	3,11	0,3284
Ukupna pogreška	0,00990528	1	0,00990528		
Ukupna (ispravljeno)	10,3741	7			

R-kvadrat = **99,9045 %**

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode)= **99,3316 %**

Standardna pogreška (procjena)= **0,0995253**

Srednja apsolutna greška = **0,0351875**



Slika 12. Pareto graf za električnu vodljivost

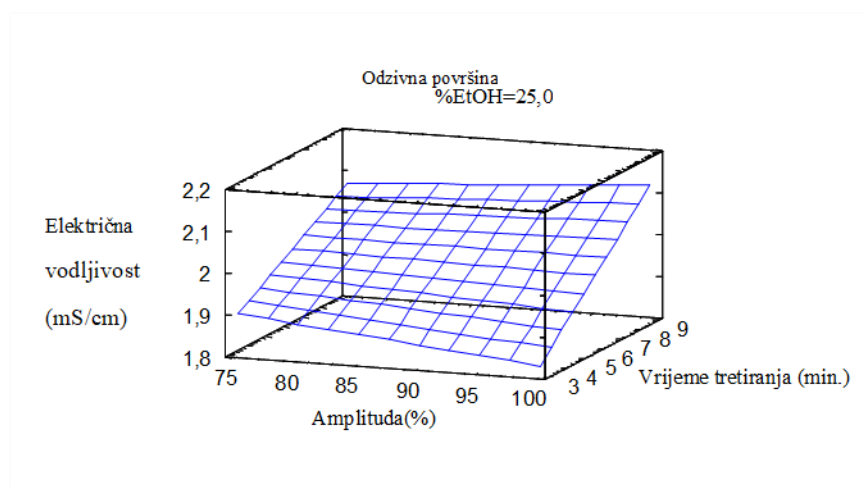
Iz tablice 14. i iz Paretovog grafa (Slika 12.) vidljivo je da je udio etanola u uzorku jedina statistički značajna vrijednosti. P-vrijednost udjela etanola je 0,0198, te se na Paretovom grafu

nalazi desno od vertikalne linije. Iz toga se može zaključiti kako udio etanola utječe na električnu vodljivost uzoraka, dok ostali parametri (amplituda i vrijeme tretiranja uzorka) ne utječu. Stoga je potrebno obratiti pažnju na udio etanola prilikom optimiranja parametara kako bi se dobila optimalna vrijednost električne vodljivosti.

Tablica 15. Optimizacija električne vodljivosti

Polinom optimizacije	Optimalna vrijednost			
El. vodljivost= $3,24537 - 0,00563 \cdot \text{Amplituda} - 0,00989583 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} - 0,041165 \cdot \% \text{EtOH} + 0,000795 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,0000106 \cdot \text{Amplituda} \cdot \% \text{EtOH} - 0,0008275 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \% \text{EtOH}$	<i>Faktor</i>	<i>Naj-niži</i>	<i>Najviši</i>	<i>Optimalno</i>
	Amplituda	75,0	100,0	100,0
	Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
	%EtOH	0,0	50,0	0,0
Električna vodljivost=3,30881 mS/cm				

Iz tablice 15. je vidljivo da su optimalne vrijednosti parametara za dobivanje optimalne električne vodljivosti: amplituda 100 %, tretiranje uzorka kroz 9 minuta i deionizirana voda kao ekstrakcijsko otapalo. Optimalna vrijednost električne vodljivosti je 3,30881 mS/cm. Amplituda i vrijeme tretiranja nisu statistički značajne vrijednosti, nije potrebno koristiti njihove maksimalne vrijednosti prilikom izvođenja eksperimenta.



Slika 13. Dijagram odzivne površine za vrijednost električne vodljivosti

Iz dijagrama odzivne površine (Slika 13.) je vidljivo da je vrijednost električne vodljivosti najveća pri tretiranju uzorka 9 minuta pri amplitudi od 100 %. Električna vodljivost je najmanja pri tretiranju uzorka 3 minute pri amplitudi od 100 %. Udio etanola (25 %) na dijagramu je fiksni parametar.

Tablica 16. p-vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (mjerene FRAP i DPPH metodama), pH i električne vodljivosti

	Pojedinačno djelovanje			Interakcije		
	A:Amplituda	B:Vrijeme tretiranja	C:%EtOH	AB	AC	BC
AA (FRAP metoda)	0,4354	0,1953	0,5028	0,4035	0,4098	0,2843
AA (DPPH metoda)	0,7664	0,9609	0,3808	0,7658	0,5062	0,8332
pH	0,4633	0,3684	0,0059	0,1055	0,1738	0,3032
El. vodljivost	0,8674	0,1861	0,0198	0,5525	0,9402	0,3284

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

AB= utjecaj amplitude i vremena tretiranja

AC= utjecaj amplitude i udjela etanola

BC= utjecaj vremena tretiranja i udjela etanola

Svaka p-vrijednost koja je veća od 0,05 nije statistički značajna. Iz tablice 16. je vidljivo da kod ultrazvučne ekstrakcije, i kod FRAP metode i kod DPPH metode, nijedna varijabla i njihove međusobne interakcije nisu statistički značajne za vrijednost antioksidacijske aktivnosti u ovom eksperimentu. Kod statističke obrade pH i električne vodljivosti, p-vrijednost za udio etanola je manja od 0,05 (0,0059 za pH i 0,0198 za električnu vodljivost) što znači da udio etanola ima statistički značaj u vrijednostima pH i električne vodljivosti. Ostale varijable (amplituda i vrijeme tretiranja), te međusobne interakcije varijabli nisu imale statistički značaj za vrijednosti pH i električne vodljivosti.

5.ZAKLJUČCI

1. Najveća vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom je $39,45 \pm 3,62 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari. Uzorak je podvrgnut ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom, a parametri ekstrakcije su : amplituda od 100 %, vrijeme tretiranja od 9 minuta i korištenje 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijsko otapalo.
2. Najveća vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom je $8,51 \pm 0,72 \mu\text{mol}$ Trolox/g suhe tvari. Uzorak je podvrgnut toplinskoj ekstrakciji, a parametri ekstrakcije su : vrijeme tretiranja od 9 minuta i korištenje 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijsko otapalo.
3. Statističkom obradom podataka uzoraka koji su podvrgnuti ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom, utvrđeno je da nijedna od nezavisnih varijabli (amplituda, vrijeme i udio etanola) nema statistički značaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti.
4. Optimalni parametri dobivanja najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije za FRAP metodu su: amplituda 100 %, vrijeme tretiranja 9 minuta i udio etanola 50 %. Za DPPH metodu, optimalni parametri su: amplituda 75 %, vrijeme tretiranja 3 minute i udio etanola 50 %.
5. Liofilizacija ne doprinosi značajno ni porastu ni padu antioksidacijske aktivnosti.
6. pH vrijednost je veća kod uzoraka koji imaju 50 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo, dok je električna provodljivost veća kod uzoraka koji imaju deioniziranu vodu kao ekstrakcijsko otapalo.
7. Statističkom obradom, utvrđeno je da udio etanola ima statističku značajnost ($p < 0,05$), dok amplituda i vrijeme tretiranja nemaju statističku značajnost na vrijednosti pH i električne vodljivosti.

6.LITERATURA

Beecher GR (1998) Nutrient Content of Tomatoes and Tomato Products, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **218**, str. 98-100
<https://doi.org/10.3181/00379727-218-44282a>

Bendicho C. iL. Lavilla (2000) Ultrasound extraction, Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias (Química), Vigo, Spain

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, April 5), Tomato, Encyclopedia Britannica
<https://www.britannica.com/plant/tomato> Pristupljeno 1.5.2023.

Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B. i sur. (2018) Bioactivities of phytochemicals present in tomato, J Food Sci. Technol. **55**, str. 2833–2849 <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z>

Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrason. Sonochem. ,**34**, str. 540–560
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Dolatowski, Z.J.; Stadnik, J.; Stasiak, D.(2007) Applications of ultrasound in food technology. Acta Sci. Polonorum Technol. Aliment., **6**, str. 89–99

Drmić Helena i Režek Jambrak Anet (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croat. J. Food Sci. Technol. **2** (2) str. 22-3

FAO (2019) Food loss and food waste. FAO- Food and Agriculture Organization
<https://www.fao.org/policy-support/policy-themes/food-loss-food-waste/en/> Pristupljeno 21.5.2023.

Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., & Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying—a review. World journal of pharmaceutical research, **4**(8), str. 516-543.

Gallo, M.; Ferrara, L.; Naviglio, D.(2018) Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. *Foods*, **7**, str. 164 <https://doi.org/10.3390/foods7100164>

George, B., Kaur, C., Khurdiya, D. S., & Kapoor, H. C. (2004) Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, **84**, str. 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00165-1)

Antonela Ninčević Grassino, Jelena Ostojić, Vicenzia Miletić, Senka Djaković, Tomislav Bosiljkov, Zoran Zorić, Damir Ježek, Suzana Rimac Brnčić, Mladen Brnčić (2020) Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 64 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102424>.

Gulcin, İ. (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* **94**, str. 651–715 <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Halliwel B (1997) Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nut*, **16**, str. 33–50

Emanuel Herrera-Pool, Ana Luisa Ramos-Díaz, Manuel Alejandro Lizardi-Jiménez, Soledad Pech-Cohuo, Teresa Ayora-Talavera, Juan C. Cuevas-Bernardino, Ulises García-Cruz, Neith Pacheco (2021) Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume **76** <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105658>

Imran, M.; Ghorat, F.; Ul-Haq, I.; Ur-Rehman, H.; Aslam, F.; Heydari, M.; Shariati, M.A.; Okuskhanova, E.; Yessimbekov, Z.; Thiruvengadam, M.; Hashempur, M.H.; Rebezov, M. (2020) Lycopene as a Natural Antioxidant Used to Prevent Human Health Disorders. *Antioxidants*, **9**, str. 706 <https://doi.org/10.3390/antiox9080706>

Jaganath, I. B., & Crozier, A. (2010) Dietary flavonoids and phenolic compounds. *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*, **1**, str. 5

Kshitiz Kumar, Shivmurti Srivastav, Vijay Singh Sharanagat (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume **70** <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Lindgren, E., Harris, F., Dangour, A.D. i sur. (2018) Sustainable food systems—a health perspective. *Sustain Sci* **13**, str. 1505–1517 <https://doi.org/10.1007/s11625-018-058>

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

Diana B. Muñiz-Márquez, Guillermo C. Martínez-Ávila, Jorge E. Wong-Paz, Ruth Belmares-Cerda, Raúl Rodríguez-Herrera, Cristóbal N. Aguilar (2013) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume **20**, 5.izd., str. 1149-1154 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.008>

Munteanu, I.G.; Apetrei, C. (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* , **22**, str. 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Inmaculada Navarro-González, Verónica García-Valverde, Javier García-Alonso, Jesús Periago (2011) Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber, *Food Research International*, Volume **44**, 5.izd., str.1528-1535 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.005>

Alberto Palma, Manuel Jesús Díaz, Mercedes Ruiz-Montoya, Emilio Morales, Inmaculada Giráldez (2021) Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from *Eucalyptus globulus* leaves through antioxidant activity, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume **76** <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105654>

Pulido, R.; Bravo, L.; Calixto, F.D.S. (2000) Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.*,

48, str. 3396–3402 <https://doi.org/10.1021/jf9913458>

Nan Shen, Tongfei Wang, Quan Gan, Sian Liu, Li Wang, Biao Jin (2022) Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity, *Food Chemistry*, Volume **383** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>

Sunpreet Singh, Seeram Ramakrishna, Munish Kumar Gupta (2017) Towards zero waste manufacturing: A multidisciplinary review, *Journal of Cleaner Production*, Volume **168**, str.1230-1243 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.108>

Qingbin Song, Jinhui Li, Xianlai Zeng (2015) Minimizing the increasing solid waste through zero waste strategy, *Journal of Cleaner Production*, Volume **104**, str. 199-210 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.027>

Souza, D. S., Marques, L. G., Gomes, E. D. B., & Narain, N. (2015) Lyophilization of avocado (*Persea americana* Mill.): effect of freezing and lyophilization pressure on antioxidant activity, texture, and browning of pulp. *Drying technology*, **33**(2), str. 194-204 <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.943766>

Brijesh K. Tiwari (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume **71**, str. 100-109 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>.

United Nations (2017), United Nations World Population Division <http://www.un.org/en/development/desa/population/> Pristupljeno 21.5.2023.

Upendra M. Sainju, Ramdane Dris and Bharat Singh (2003) Mineral nutrition of tomato, Agricultural Research Station

Whitmee, S., Haines, A., Beyrer, C., Boltz, F., Capon, A. G., de Souza Dias, B. F., & Yach, D. (2015) Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation–Lancet Commission on planetary health. *The lancet*, **386**(10007), str. 1973-2028 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60901-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60901-1)

Yasui, K. (2018) Acoustic Cavitation. In: Acoustic Cavitation and Bubble Dynamics. SpringerBriefs in Molecular Science, Springer, Cham <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68237-2>

Izjava o izvornosti

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

Sara Laguljić
Vlastoručni potpis

