

# Priprema i karakterizacija ekstrakta lavande u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu te ispitivanje njegovog utjecaja na stabilnost voćnih pločica na bazi komine grožđa

---

Tolić, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:077582>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Laura Tolić**

0177058975

**PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LAVANDE U PRIRODNOM  
NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU TE ISPITIVANJE  
NJEGOVOG UTJECAJA NA STABILNOST VOĆNIH PLOČICA NA BAZI KOMINE  
GROŽĐA  
ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina, KK.01.1.1.07.007.

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Zagreb, 2024.**

*Zahvaljujem svojim roditeljima, obitelji, prijateljima i svima koji su me podržavali i usmjeravali na ovom putu. Bez vaše podrške ne bih bila tu gdje jesam. Također, zahvaljujem dr. sc. Manueli Panić na pruženoj pomoći, strpljenju i izdvojenom vremenu za moje upite i dileme vezane uz ovaj rad.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Priprema i karakterizacija ekstrakta lavande u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu te ispitivanje njegovog utjecaja na stabilnost voćnih pločica na bazi komine grožđa**

**Laura Tolić, 0177058975**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je pripremiti ekstrakte lavande u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu (NADES), okarakterizirati ekstrakt te ispitati njegov utjecaj na antioksidacijsku stabilnost na sobnoj temperaturi u sirovim kolačima na bazi suhog voća s dodatkom komine grožđa i datulje. Antioksidacijska svojstva ekstrakata ispitivana su DPPH i FRAP metodom. Koncentracije ukupnih polifenola određivane su pomoću Folin – Ciocalteu reagensa. NADES otapalo, u usporedbi s etanolom, bolje ekstrahira polifenole iz lavande. Prema DPPH testu, ekstrakti u NADES otapalu pokazuju veći antioksidacijski potencijal nego oni u etanolu, što je dijelom rezultat antioksidacijskog potencijala samog NADES otapala. Samo NADES otapalo ima dobar antioksidacijski potencijal najvjerojatnije zbog prisutnosti askorbinske kiseline.

Dodatak NADES otapala s ekstraktom pokazuje pozitivan utjecaj na antioksidacijski potencijal voćnih pločica, što je potvrđeno različitim metodama, uključujući DPPH i FRAP.

**Ključne riječi:** antioksidacijski kapacitet, ekstrakt lavande, polifenolni spojevi, prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, voćne pločice na bazi komine grožđa

**Rad sadrži:** 28 stranica, 14 slika, 1 tablica, 23 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Manuela Panić

**Datum obrane:** 16. srpnja, 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Preparation and characterization of lavender extract in natural deep eutectic solvent and their influence on the stability of grape pomace-based fruit bars**

**Laura Tolić, 0177058975**

**Abstract:** The aim of this work was to prepare lavender extracts in a natural low-temperature eutectic solvent (NADES), characterize the extract and examine its influence on the antioxidant stability at room temperature in raw cakes based on dried fruit with the addition of grape pomace and dates. The antioxidant properties of the extracts were tested using the DPPH and FRAP methods. Concentrations of total polyphenols were determined using the Folin-Ciocalteu reagent. NADES solvent, compared to ethanol, better extracts polyphenols from lavender. According to the DPPH test, extracts in NADES solvent show higher antioxidant potential than those in ethanol, which is partly a result of the antioxidant potential of NADES solvent itself. Only NADES solvent has a good antioxidant potential, most likely due to the presence of ascorbic acid.

The addition of NADES solvent with the extract shows a positive influence on the antioxidant potential of the fruit slices, which was confirmed by different methods, including DPPH and FRAP.

**Keywords:** antioxidant capacity, lavender extract, polyphenolic compounds, natural low-temperature eutectic solvent, fruit bars based on grape pomace

**Thesis contains:** 28 pages, 14 figures, 1 table, 23 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Technical support and assistance:** dr.sc. Manuela Panić

**Thesis defended:** July 16, 2024

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ZELENA EKSTRAKCIJA .....	2
2.1.1. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA.....	3
2.1.2. SVOJSTVA EUTEKTIČNIH OTAPALA .....	4
2.1.3. PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U EKSTRAKCIJI BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA.....	5
2.2. OTPAD VINSKE INDUSTRIJE – KOMINA GROŽĐA.....	5
2.2.1. KOMINA GROŽĐA KAO IZVOR POLIFENOLA .....	6
2.2.2. LAVANDA KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA .....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	10
3.1. MATERIJALI .....	10
3.1.1. KEMIKALIJE, OTOPINE I PUFERI.....	10
3.1.2. APARATURA I PRIBOR.....	11
3.2. METODE RADA .....	11
3.2.1. SINTEZA NADES OTAPALA .....	11
3.2.2. PRIPREMA EKSTRAKTA LAVANDE U NADES OTAPALU.....	11
3.2.3. ANALIZA EKSTRAKTA LAVANDE .....	12
3.2.4. PRIMJENA EKSTRAKTA LAVANDE U IZRADI VOĆNIH PLOČICA NA BAZI KOMINE GROŽĐA .....	13
3.2.5. ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA VOĆNIH PLOČICA NA BAZI KOMINE GROŽĐA .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LAVANDE .....	15
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA STABILNOST VOĆNIH PLOČICA I ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA.....	20
5. ZAKLJUČCI.....	25



## 1. UVOD

Industrija proizvodnje vina generira ogromne količine nusproizvoda, među kojima je najistaknutija groždana komina koja se sastoji od sjemenki, pokožice i peteljki grožđa (Costa i sur., 2019). Ovaj otpad je bogat polifenolnim spojevima i sekundarnim biljnim metabolitima, s potencijalno pozitivnim učincima na zdravlje ljudi (Antonić i sur., 2020). Reciklirajući ovaj otpad kao sirovinu za izoliranje biološki aktivnih spojeva, moguće je povećati isplativost proizvodnje smanjenjem količine otpada i stvaranjem dodatne vrijednosti. Potpuno iskorištavanje ovog nusproizvoda korisno je i za smanjenje zagađenja okoliša i postizanje održivosti u prehrambenoj industriji (Cai i sur., 2021).

Da bi se biološki aktivne tvari iz ovog nusproizvoda mogle koristiti u prehrambenoj industriji, potrebno je identificirati ekstrakcijska otapala koja su bezopasna za ljudsku konzumaciju, a istovremeno omogućavaju dobivanje ekstrakata koji su odmah primjenjivi. U posljednje vrijeme, predstavljena su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) kao mogući izbor otapala za primjenu u prehrambenoj industriji, koja su kombinacija prirodnih primarnih metabolita, poput šećera, aminokiselina ili poliola, čija je konzumacija smatrana sigurnom za ljudsku prehranu (Panić i sur., 2019).

Cilj ovog rada je pripremiti ekstrakte lavande u multikomponentnom NADES otapalu, okarakterizirati ekstrakt te ispitati njegov utjecaj na antioksidacijsku stabilnost na sobnoj temperaturi u sirovim kolačima na bazi suhog voća s dodatkom komine grožđa i datulje.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Zelena ekstrakcija

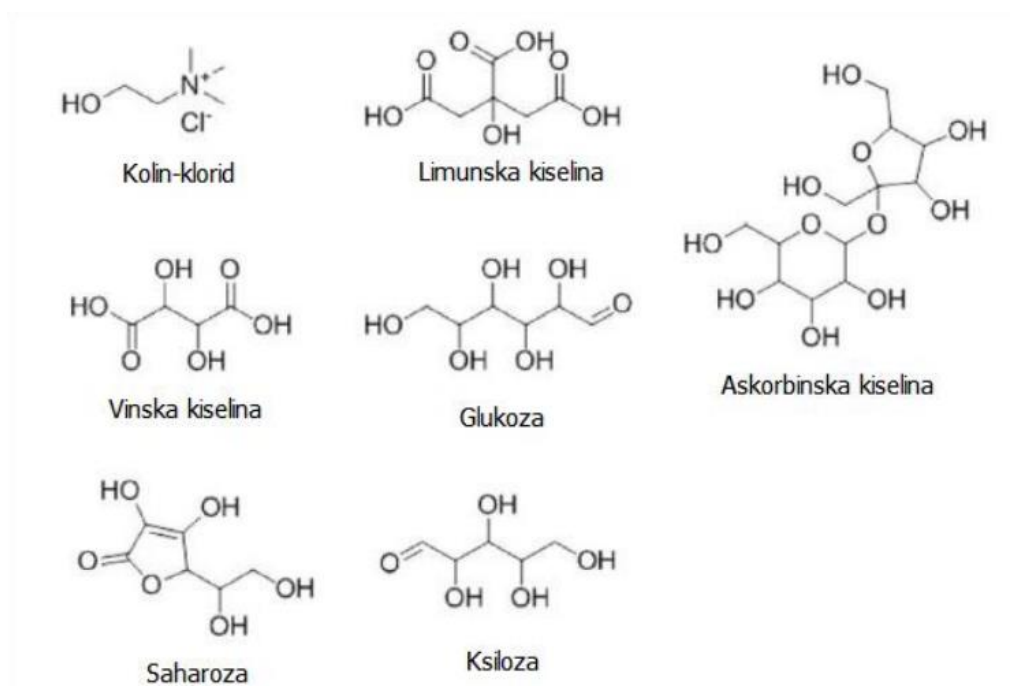
U mnogim industrijama koriste se razna otapala za ekstrakciju čvrstih komponenti, prijenos tvari i topline, te za odvajanje i čišćenje proizvoda. Međutim, smatra se da hlapljiva organska otapala mogu uzrokovati brojne štetne ekološke posljedice, kao što su globalno zatopljenje, zagađenje zraka, degradaciju ozonskog omotača, te utjecaj na ljudsko zdravlje. Većina tradicionalno korištenih organskih otapala su toksična, zapaljiva i korozivna, a njihovo ponovno korištenje i regeneracija često zahtijevaju energetske intenzivnu destilaciju s velikim gubicima (Radović i sur., 2021). Današnja potreba za ekstraktima biološki aktivnih spojeva najčešće se zadovoljava ekstrakcijom uz upotrebu organskih otapala poput metanola, etanola i acetona (Chen i sur., 2019).

Kemičar P. T. Anastas je 1991. godine istaknuo je potrebu za smanjenjem upotrebe štetnih otapala i pronalaskom novih, ekološki prihvatljivih i sigurnih otapala koja se mogu reciklirati. Ovo je pokrenulo program zvan zelena kemija, koji teži postizanju ravnoteže između ekonomskih i ekoloških zahtjeva tijekom proizvodnje raznih industrijskih kemikalija (Radović i sur., 2021). Upravo je jedan od ključnih segmenata zelene kemije zelena ekstrakcija koja podrazumijeva dizajniranje procesa ekstrakcije na način da se smanji potrošnja energije, omogući upotreba alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda, te se osigura siguran i visokokvalitetan proizvod. S obzirom na rastuću potražnju za održivim i zelenim procesima, razvoj zelenih otapala postaje glavni prioritet za postizanje sigurnijih metoda ekstrakcije (Morgana i sur., 2022).

U skladu s principima zelene kemije, alternativna otapala trebaju biti usmjerena na sigurnost radnika (netoksičnost, nekancerogenost, nemutagenost), sigurnost procesa (nezapaljivost, neeksplozivnost, nehlapljivost), sigurnost okoliša (ekotoksičnost, biodegradabilnost, nepostojanost) i održivost procesa (recikliranje i mogućnost ponovne upotrebe). Zbog toga bi istraživači trebali razmatrati upotrebu novih netoksičnih otapala koja zadovoljavaju GRAS (eng. Generally Recognised as Safe) status. Među njima se ističu ionske kapljevine, superkritični fluidi, fluorirana otapala, te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (kao što su niskotemperaturna eutektička otapala i otapala na bazi glicerola) (Radović i sur., 2021). Unatoč prednostima ionskih kapljevina, koje su nezapaljive, nehlapljive i lako se recikliraju, one su na bazi nafte, što utječe na njihovu sigurnost i prikladnost za primjenu u prehrambenoj industriji (Mišan i sur., 2020). Nedavno su se niskotemperaturna eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES) počela koristiti kao nova i zelena alternativa ionskim kapljevinama (Chen i sur., 2019).

### 2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Upotreba niskotemperaturnih eutektičnih otapala (DES), zelenih otapala na bazi prirodnih sastojaka, smatra se potencijalnom, ekološki prihvatljivom alternativom tradicionalnim organskim otapalima (Mišan i sur., 2020). DES-ovi su pokazali široku primjenu u različitim područjima poput elektrokemije, organske sinteze, (bio)katalize, biotehnologije, prehrambene tehnologije, farmaceutskog inženjerstva i biomedicine (Radović i sur., 2021). Ova zelena otapala privlače znanstvenike zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava poput tekućeg stanja na širokom temperaturnom rasponu, zanemarive hlapljivosti, biorazgradivosti, kemijske i toplinske stabilnosti, nezapaljivosti, netoksičnosti (Panić i sur., 2021; Mišan i sur., 2020). DES-ovi su eutektičke smjese sastavljene od prirodnih metabolita koji se nalaze u biljnim i ljudskim stanicama ili mikroorganizmima (Morgana i sur., 2022).



**Slika 1.** Kemijske strukture različitih tvari koje mogu biti sastavne komponente prirodnih eutektičnih otapala (Paiva i sur., 2014).

DES je smjesa dva ili više metabolita koje su međusobno povezane vodikovim vezama, a karakterizira ga eutektičnost, odnosno ima temperaturu tališta koja je znatno niža od temperature tališta njegovih sastavnih komponenti (Palmelund i sur., 2019). To je rezultat delokalizacije naboja koja ometa sposobnost kristalizacije kod jakih međumolekulskih interakcija (Radović i sur., 2021). DES-ovi se mogu jednostavno sintetizirati miješanjem akceptora vodikove veze (HBA) i donora vodikove veze (HBD) u određenom stehiometrijskom

omjeru, uz zagrijavanje i miješanje na atmosferskom tlaku dok se ne dobije homogena smjesa. Najčešće korišteni HBA su kvaterne amonijeve soli (npr. kolin klorid), dok HBD mogu biti urea, etilen glikol, glicerol, šećeri, aminokiseline i karboksilne kiseline (Panić i sur., 2021; Chen i sur., 2019). Ako su DES-ovi pripremljeni od organskih kiselina, aminokiselina, šećera ili uree, spojevi prikazani na slici 1, oni se nazivaju prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (NADES). Njihova prednost u odnosu na ionske kapljevine i DES-ove leži u manjoj toksičnosti, pozitivnijem utjecaju na okoliš i većoj održivosti. Osim toga, njihova je priprema jeftina, mogu se reciklirati i sastojci za pripremu lako su dostupni u prirodi (Mišan i sur., 2020). NADES-i se mogu pripremiti koristeći razne fizikalne metode, uključujući isparavanje, zagrijavanje uz miješanje, sušenje smrzavanjem, mljevenje, zagrijavanje uz pomoć ultrazvuka i mikrovalova (Mišan i sur., 2020). Ipak, najčešće se koristi metoda pripreme NADES-a zagrijavanjem uz miješanje. Ova metoda ne samo da je ekonomična, već omogućava i jednostavno održavanje konstantne temperature i formiranje NADES-a, što je od velike važnosti kada se koriste termički nestabilne komponente (Radović i sur., 2021; Mišan i sur., 2020).

### **2.1.2. Svojstva eutektičnih otapala**

Jedna od ključnih karakteristika DES-ova je njihova mogućnost upotrebe kao otapala za ekstrakciju širokog spektra različitih molekula. Primjena DES-ova u ekstrakciji ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, poput točke taljenja, viskoznosti, gustoće, polarnosti i pH-vrijednosti, koja su pak ovisna o strukturi i međumolekulskim interakcijama komponenti DES-a (Mišan i sur., 2020).

Gustoća DES-ova obično je veća od gustoće vode i uobičajenih organskih otapala (kao što su etanol, metanol, n-heksan, itd.) i varira od 1,1 do 1,4 g/cm<sup>3</sup> (Radović i sur., 2021). Osim toga, viskoznost DES-ova generalno je veća od viskoznosti standardnih organskih otapala na sobnoj temperaturi (veća od 0,1 Pa s) zbog smanjene pokretljivosti slobodnih grupa pod utjecajem jakih međumolekulskih interakcija te zbog malih praznina u strukturi (Hansen i sur., 2020). Priroda komponenti koje čine DES utječe na njegovu pH-vrijednost. Otapala sa organskom kiselinom kao donatorom vodikove veze su kiseli (pH < 3), dok su otapala koja sadrže amid kao donor vodikove veze bazična (pH > 8) (Radović i sur., 2021). S obzirom na polarnost, najčešće korišteni DES-ovi su polarni, pri čemu su otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna (Mišan i sur., 2020). DES-ovi se smatraju ekološki sigurnima i netoksičnim zelenim otapalima. No, važno pitanje za njihovu komercijalnu primjenu jest njihov toksikološki utjecaj na različite žive organizme. To se odnosi na toksičnost i biorazgradivost DES-ova, gdje se pretpostavlja da su ova otapala

sigurna na temelju podataka o njihovoj kemijskoj prirodi, odnosno toksičnosti pojedinačnih komponenti od kojih se sastoje (većinom iz prirodnih izvora) (Mišan i sur., 2020). Većina ispitivanih NADES-a smatra se biorazgradivima jer su komponente koje čine takva otapala primarni metaboliti (aminokiseline, šećeri, itd.), koje različiti prirodni organizmi mogu razgraditi (Radović i sur., 2021).

### **2.1.3. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva**

U posljednjim godinama, DES-ovi su intenzivno proučavani u različitim područjima: (1) elektrokemiji, zahvaljujući njihovoj električnoj provodljivosti; (2) sintetskoj kemiji i (bio)katalizi, zbog sposobnosti otapanja organskih i anorganskih spojeva; (3) biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji, u procesima ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz prirodnih izvora, obradi lignoceluloznih materijala, te proizvodnji biodizela; (4) procesima separacije; (5) farmaceutskom inženjeringu, za razvijanje novih formulacija aktivnih farmaceutskih sastojaka kao jedne od komponenti THEDES-a; (6) biomedicini, kao sredstvo za očuvanje bioloških molekula i materijala i dr. (Radović i sur., 2021).

Dizajniranje zelenih i održivih metoda ekstrakcije zahtijeva otapala koja pružaju efikasnu, sigurnu, održivu i ekonomičnu alternativu tradicionalnim otapalima. To bi također trebalo uključiti smanjenje potrebne energije u koracima pročišćavanja ekstrakata. Ekstrakti koji su odmah spremni za upotrebu, a koji se mogu direktno primjenjivati u različitim prehrambenim, kozmetičkim, agrokemijskim i farmaceutskim proizvodima, su poželjni jer izbjegavaju dodatne, skuplje korake pročišćavanja (Panić i sur., 2021; Mišan i sur., 2020). Očekuje se da se takvi ekstrakti mogu proizvesti pomoću NADES-a, s obzirom na to da su njegove komponente prirodno prisutne i dio su naše svakodnevne prehrane (Panić i sur., 2019), što predstavlja veliku prednost u usporedbi s tradicionalnim otapalima te su NADES otapala sastavni dio finalnog proizvoda – ekstrakta (Mišan i sur., 2020).

## **2.2. Otpad vinske industrije – komina grožđa**

Iako se proizvodnja vina tradicionalno smatrala ekološki prihvatljivim postupkom, sama proizvodnja zahtijeva veliku količinu resursa poput vode, gnojiva i organskih dodataka te stvara znatne količine nusproizvoda i otpada (Bordiga i sur., 2019; Costa i sur., 2019). Valorizacijom komine grožđa, otpadom vinarske industrije, proces proizvodnje vina može biti poboljšan kroz iskorištavanje biološki aktivnih spojeva iz komine, čime se stvara dodatna ekonomska vrijednost i smanjuje negativan ekološki utjecaj (Sokač i sur., 2022).

Komina grožđa se tradicionalno koristila u proizvodnji raznih destilata, kao gnojivo ili dodatak stočnoj hrani (Caponio i sur., 2022; Bordiga i sur., 2019). Međutim, prisutnost polimernih polifenola (lignina) ograničava njenu probavljivost jer inhibiraju celulolitičke i proteolitičke

enzime, kao i rast bakterija buraga (Fontana i sur., 2013). Osim toga, odlaganje velikih količina komine na odlagališta tijekom sezone berbe može imati negativne učinke na biorazgradnju zbog polifenola koji smanjuju pH-vrijednost i inhibiraju mikrobiološku razgradnju (Antonić i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019).



**Slika 2.** Komina grožđa ( Anonymous 1, 2016)

S druge strane, komina grožđa, na slici 2, sadrži značajne količine tvari koje se mogu ekstrahirati i izolirati, a istovremeno su korisne za zdravlje (Panić i sur., 2019). Glavne komponente komine grožđa su pokožice, sjemenke, peteljke i ostatak pulpe (Bordiga i sur., 2019; Costa i sur., 2019). Kominu karakteriziraju pretežno dijetalna vlakna, posebno glikan, celuloza i pektin, te polifenolni spojevi koji ostaju u komini nakon procesa proizvodnje vina (Antonić i sur., 2020) zbog nepotpune ekstrakcije (Corrêa i sur., 2017), naglašavajući moguću nutritivnu vrijednost komine grožđa kao dodatka prehrani (Fontana i sur., 2013). Okolišni čimbenici poput sorte, sadnje i uzgoja, kao i način prerade grožđa u proizvodnji vina, mogu utjecati na kemijski sastav komine. Unatoč intenzivnim procesima tijekom prerade grožđa (npr. prešanje), kemijski sastav komine, posebno u pogledu sadržaja biološki aktivnih spojeva, ne mijenja se značajno. Stoga, velika količina bioaktivnih molekula ostaje u ovom nusproizvodu (Punzo i sur., 2021; Dabetić i sur., 2020).

### **2.2.1. Komina grožđa kao izvor polifenola**

Komina grožđa karakterizirana je velikim količinama polifenola zbog nepotpune ekstrakcije tijekom procesa proizvodnje vina (Antonić i sur., 2020; Fontana i sur., 2013). Polifenoli su jedna od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih tvari u biljnom svijetu. Trenutno

je poznato više od 8000 različitih polifenolnih struktura. Ovi spojevi su sekundarni metaboliti biljaka i njihova primarna funkcija je zaštita biljaka od patogena i UV zračenja. Polifenolni spojevi postoje u različitim oblicima spojeva, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, antocijanini, tanini, lignani i stilbeni (Cai i sur., 2021). Fenolni spojevi sadržani u grožđu i vinu općenito se mogu klasificirati u tri skupine: fenolne kiseline (benzojeva i hidroksicimetna kiselina), jednostavni flavonoidi (katehini, flavonoli i antocijani) te tanini i proantocijanidini (Sokač i sur., 2022). Među fenolnim spojevima grožđa najzastupljeniji su antocijanini, hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina (posebno esteri vinske kiseline), flavonoli, flavan-3-oli i stilbeni (Bordiga i sur., 2019).

Poznato je da polifenoli imaju antioksidativna i protuupalna svojstva, a mnoge studije podupiru da bi polifenoli mogli pomoći u prevenciji ili djelovati kao terapijski agensi za neurodegenerativne, kardiovaskularne ili bubrežne bolesti. U zdravstvenom području postoje studije o učinku polifenola iz prirodnih izvora u prevenciji i liječenju raka. Na primjer, Hamza et al. pružili su dokaze da ekstrakt sjemenki grožđa ima antikancerogeni učinak kod raka jetre inhibicijom stanične proliferacije, pospješivanjem apoptoze, modulacijom oksidativnog oštećenja i supresijom upalnog odgovora. Kao posljedica toga, postoji veliki interes za korištenje ovih spojeva u lijekovima, kozmetici ili između ostalog, kao dodaci hrani.

Antioksidansi su skupina različitih prirodnih spojeva koji igraju ključnu ulogu u zaštiti od štetnog djelovanja slobodnih radikala, neutralizirajući već nastale slobodne radikale ili sprječavajući njihovo nastajanje. Imaju ključnu ulogu i u zaštiti biljnih stanica, očuvanju kvalitete voća i povrća te u poboljšanju zdravlja ljudi koji konzumiraju ove namirnice bogate antioksidansima. Nadalje, antioksidansi i enzimski sustavi uključeni u njihovu sintezu i obnovu štite stanične membrane i organele od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim jedinkama (ROS) (Arruda i Pastore, 2019).

Antioksidansi mogu inhibirati ili odgoditi oksidaciju na dva načina. Prvi način uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala, a takve komponente se nazivaju primarnim antioksidansima. Drugi obuhvaća mehanizme koji ne uključuju direktno uklanjanje slobodnih radikala, u tom slučaju komponente se nazivaju sekundarnim antioksidansima. Sekundarni antioksidansi imaju sljedeće mehanizme djelovanja: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u ne-radikalne vrste, apsorpcija UV radijacije i deaktivacija singleton kisika (Pokorny, 2001.).

Antioksidansi mogu biti enzimi ili različite male neenzimatske molekule, kao što su fenoli, glutation i askorbinska kiselina. Vitamini i polifenoli su važne komponente u voću i povrću koje posjeduju antioksidativnu aktivnost. Od ne-enzimskih antioksidansa, koji su općenito male molekule, askorbinska kiselina igra važnu ulogu u uklanjanju ROS-a, dok je glutation ključan za obnavljanje dehidroaskorbinske kiseline (DHAA) koja nastaje tijekom uklanjanja ROS-a

askorbat-glutationskim ciklusom (Arruda i Pastore, 2019).

Oksidativni stres relativno je nov koncept koji se široko koristi u medicinskim znanostima u posljednja tri desetljeća. Aktivno sudjeluje u fiziologiji vrlo čestih bolesti, kao što su dijabetes, visoki krvni tlak, akutno zatajenje bubrega, Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Stanice metaboliziranjem kisika stvaraju ROS koje su potencijalno štetne. U normalnim okolnostima, brzina i amplituda stvaranja oksidansa je uravnotežena brzinom njihovog uklanjanja (Munteanu i Apetrei, 2021). Međutim, gubitak ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa rezultira oksidativnim stresom. Visoke razine ROS-a u biološkim stanicama imaju velik utjecaj na njihovo funkcioniranje, što dovodi do nedovoljnog rada stanica, starenja ili bolesti.

Brojna istraživanja pokazuju da antioksidansi igraju bitnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja, prevenciji i liječenju bolesti, zbog svoje sposobnosti smanjenja oksidativnog stresa. Mjerenje antioksidativne aktivnosti/kapaciteta hrane i bioloških uzoraka stoga je bitno ne samo u osiguravanju kvalitete funkcionalne hrane, već još važnije u proučavanju učinkovitosti antioksidansa u hrani u prevenciji i liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Munteanu i Apetrei, 2021). Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri kategorije: spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske metode. ABTS, DPPH, ORAC i FRAP su spektrometrijske metode kod kojih se rezultati podudaraju kad se mjerenja antioksidativne aktivnosti provode u metanolnim ekstraktima. DPPH metoda temelji se na mjerenju (pomoću spektrofotometra) sposobnosti redukcije 2,2- difenilpikrilhidrazil radikala pomoću antioksidansa (Arruda i Pastore, 2019).

### **2.2.2. Lavanda kao izvor biološki aktivnih spojeva**

Rod *Lavandula* je raširen u mediteranskoj regiji, a njegove vrste, posebno *Lavandula stoechas subsp. stoechas*, vrijedni su izvori aktivnih spojeva s brojnim biološkim koristima koje treba očuvati i valorizirati (Jaouani i sur., 2024).



**Slika 3.** Lavanda ( Anonymous 2, 2009)

Zbog njihove ekonomske vrijednosti, mnogi istraživači su tijekom proteklih nekoliko desetljeća proučavali fitokemijske i farmakološke aspekte vrsta *Lavandula*. Lavanda, na slici 3, sadrži brojne fitokemijske spojeve, uključujući flavonoide poput epikatehina i epikatehin galata, fenole kao što su ružmarinska kiselina i kavena kiselina, eterična ulja s kamforom, fenonom i 1,8 cineolom kao glavnim spojevima te mnoge druge biomolekule (Jaouani i sur., 2024). Fenolni spojevi, također sadržani u biljaka roda *Lavandula*, imaju širok raspon fizioloških svojstava, kao što su antialergijska, antiaterogena, protuupalna, antimikrobna, antitrombotična, kardioprotektivna i vazodilatacijska, a smatra se da su mnoga od ovih svojstava posljedica antioksidativnog djelovanja, uključujući različite mehanizme kao što su hvatanje slobodnih radikala, donacija atoma elektrona ili vodika ili kelacija metalnih kationa (Torras-Claveria i sur, 2007).

Upravo zbog toga što eterična ulja ili ekstrakti lavande pokazuju širok spektar farmakoloških aktivnosti, upotrebljuju se kao sedativi, protuupalni agensi, antioksidansi, antimikrobni, antifungalni i insekticidni agensi, a također je prijavljena potencijalna upotreba eteričnih ulja lavande i njihovih nusproizvoda u bijeloj biotehnologiji ili kao dodataka (Héral i sur., 2021).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Pri izradi ovoga rada korištena je komina hrvatske autohtone sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina, dobivena od Kutjevo d. d. Komina je korištena u izradi sirovih voćnih pločica. Također je korištena lavanda za izradu ekstrakta, porijekla Suban.

##### 3.1.1. Kemikalije, otopine i puferi

###### Kemikalije

- Deionizirana voda (PBF, Zagreb, RH)
- Etanol (Kemika, Zagreb, RH)
- Metanol (Merck, Dormstadt, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, RH)

###### Otopine i puferi

- 300 mM acetatni pufer: 1,55 g natrijevog acetat trihidrata (Kemika, Zagreb, RH) otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T.Baker, Gliwice, Poljska) u odmjernoj tikvici od 500 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom
- 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (abcr GmbH, Karlsruhe, Njemačka) u 96% metanolu
- FRAP reagens: promiješano 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagens a i 5mL FeCl (omjer 10:1:1)
- otopina galne kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska)
- 20%-tna otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Kemika, Zagreb, RH)
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (Kemika, Zagreb, RH) : 0,312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 100 mL sa 40 mM HCl te nadopuni do oznake
- 1mM otopina standarda Trolox-a (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 20 mM otopina željezovog (III) klorida,  $\text{FeCl}_3$  (GRAM MOL, Zagreb, RH): 0,5406 g

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  otopi u 10 mL destilirane vode

- standard željezo (II) sulfat septahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, RH): 0,139 g se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L te nadopuni do oznake destiliranom vodom

### 3.2.2. Aparatura i pribor

1. Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
2. Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia
3. Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
4. HPLC, PerkinElmer Series 200
5. Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, ljevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)
6. UV-Vis spektrofotometar, GENESYS™10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
7. Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

## 3.2.METODE RADA

### 3.2.1.Sinteza NADES otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala sintetizirana su u orbitalnom homogenizatoru. Prema određenim omjerima, koji su prikazani u tablici 1, izračuna se masa komponenata otapala te se doda u staklenu laboratorijsku bocu s 30% (w/w) vode. Smjesa se zatim homogenizira miješanjem pri temperaturi od 50°C kroz 2 sata u zatvorenom sustavu dok ne nastane homogena, tekuća, prozirna i viskozna smjesa. Pripremljeno otapalo zatim se dobro zatvori i čuva na sobnoj temperaturi do sljedećega korištenja.

**Tablica 1.** Molarni omjeri pojedinih komponenti za pripremu NADES otapala

Betain	Limunska kiselina	Sorbitol	Saharoza	Askorbinska kiselina
1	0,2	1	1	1

### 3.2.2.Priprema ekstrakta lavande u NADES otapalu

U epruvetu se odvaži 1 g samljevenoga osušenoga uzorka lavande te se doda 10 mL pripremljenog NADES otapala, dok su za usporedbu korištene iste količine konvencionalnih otapala za ekstrakciju (45 %-tna (w/w, %) vodena otopina vodena otopina etanola). Ekstrakcija polifenolnih spojeva provodi se ukupno 2 sata na 50 °C uz miješanje u homogenizatoru. Nakon

zadanoga vremena, ekstrakcija se prekida te se provodi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio ukupnih polifenola zatim se odredi prema Folin-Ciocalteu metodi, a antioksidacijska aktivnost prema DPPH i FRAP metodi.

### **3.2.3. Analiza ekstrakta lavande**

#### **Određivanje koncentracije ukupnih polifenola**

U epruvetu se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 50  $\mu$ L 100 puta razrijeđenog ekstrakta lavande u etanolu ili 1000 puta razrijeđenog ekstrakta lavande u NADES otapalu, 250  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 750  $\mu$ L 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon dodatka 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na 765 nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži 100  $\mu$ L destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg/L), koncentracije otopina korištenih za izradu baždarnog dijagrama su 0; 25; 50; 75; 100; 200; 250; 400 i 500 mg/L. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GA) po gramu uzorka.

#### **Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 100  $\mu$ L ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije  $\Delta A$  o koncentraciji mM/L, odnosno baždarni pravac. Koncentracije otopina korištenih za izradu baždarnog dijagrama su 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mM u metanolu. Promjena apsorbancije DPPH radikala ( $\Delta A$ ), nakon reakcije s uzorkom, računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mmol/g) ekvivalent Trolox-a.

#### **Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom**

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije 300 mM, 10 mM otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) te 20 mM vodenu otopinu željezo(III)- klorid-

heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \times n \text{6H}_2\text{O}$ ). FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , tako da omjer dodanih otopina bude 10 :1 :1. Za postupak mjerenja, u kivetu se pomiješa 50  $\mu\text{L}$  uzorka i 950  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa (950  $\mu\text{L}$ ).

Za određivanje nepoznate koncentracije u uzorku, potrebno je prethodno izraditi baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji otopine Trolox-a. Koncentracije otopina  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kao standarda korištenih za izradu baždarnog dijagrama su 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mM. Za izračunavanje nepoznate koncentracije u uzorku prema baždarnom pravcu, potrebno je prvo oduzeti apsorbanciju slijepe probe od apsorbancije uzorka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mM ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) te se izražavaju kao molarni (mmol/g) udio ekvivalenata.

### **3.3.3. Primjena ekstrakta lavande u izradi voćnih pločica na bazi komine grožđa**

Pločice su pripremljene u Zavodu za procesno inženjerstvo i dalje analizirane. Ukratko, jestive funkcionalne pločice izrađene su kroz nekoliko koraka. Prvo, sušeno voće se melje kako bi se dobilo mljeveno sušeno voće. Zatim se sjemenke grožđa odvajaju iz komine grožđa, a preostala komina grožđa bez sjemenki koristi se kao sastojak te se melje. Lješnjaci i sjemenke kakaa također se melju kako bi se dobili mljeveni lješnjaci i kakao prah.

Nadalje, dodaje se i pripremljeni ekstrakt lavande u NADES otapalu, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.

Svi sastojci se zatim homogeniziraju miješanjem na umjerenj temperaturi, stvarajući smjesu koja se oblikuje u pločice. Pločice se potom suše, hlade, i pakiraju u plastične vrećice.

#### **3.3.4. Analiza antioksidacijskog potencijala voćnih pločica na bazi komine grožđa**

Analiza antioksidacijskog potencijala voćnih pločica provodila se analizom njihovih etanolnih ekstrakata. Prije pripreme samih ekstrakta potrebno je usitniti uzorak voćne pločice i pripremiti 70 %-tnu otopinu etanola kao ekstrakcijskog otapala. Izvaže se 3 g usitnjenog uzorka i doda u 90 mL ekstrakcijskog otapala prethodno temperiranog na 50 °C u vodenoj/uljnoj kupelji (IKA, Njemačka). Ekstrakcija se provodi 30 min pri brzini okretaja miješalice od 500 rpm u pokrivenim staklenim čašama, kako bi se spriječilo isparavanje otapala. Dobiveni ekstrakt se profiltrira na setu za vakuum filtraciju (Rocker) i spremi u Falkon kivete od 50 mL. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču do provođenja analiza.

Zatim je na dobivenim uzorcima provedena analiza antioksidacijskog potencijala koja uključuje određivanje koncentracije ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom na isti opisani način kao u poglavlju 3.2.3., bez prethodnog razrjeđenja uzoraka.

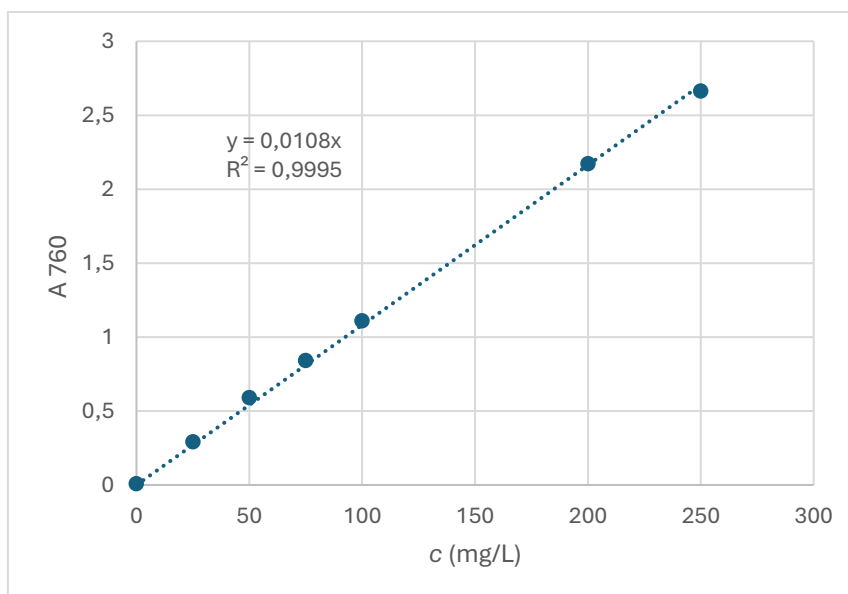
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je pripremiti ekstrakte lavande u multikomponentnom NADES otapalu, okarakterizirati ekstrakt te ispitati njegov utjecaj u sirovim kolačima na bazi suhog voća s dodatkom komine grožđa. Eksperiment je započet s pripremom ekstrakta u NADES otapalu i izradom kolačića te određivanjem koncentracije ukupnih polifenola i određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka pomoću DPPH i FRAP metoda. Sam ekstrakt lavande u NADES otapalu je uspoređen s ekstraktom lavande u etanolu. Dok je utjecaj NADES ekstrakta u voćnim pločicama uspoređen s voćnim pločicama bez dodatka ekstrakta.

### 4.1.PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LAVANDE

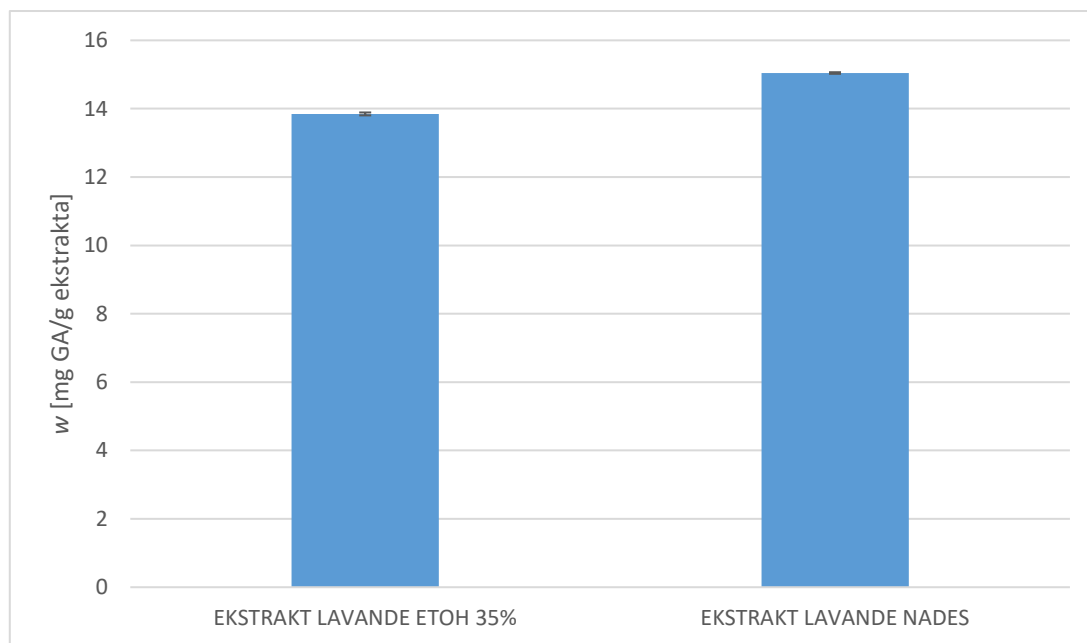
#### Određivanje koncentracije ukupnih polifenola

Za izradu baždarnog dijagrama spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija šest otopina galne kiseline koncentracija: 0; 25; 50; 75; 100; 200; 250; 400 i 500 mg/L. Baždarni dijagram, prikazan na slici 1, prikazuje ovisnost apsorbancije pri valnoj duljini od 760 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline u analiziranim otopinama.



Slika 4. Baždarni dijagram galne kiseline

Dobivena jednažba pravca glasi:  $y=0,0108x$ . Iz dobivene jednažbe pravca su izračunati mg ekvivalenta galne kiseline(GA) po gramu uzorka.

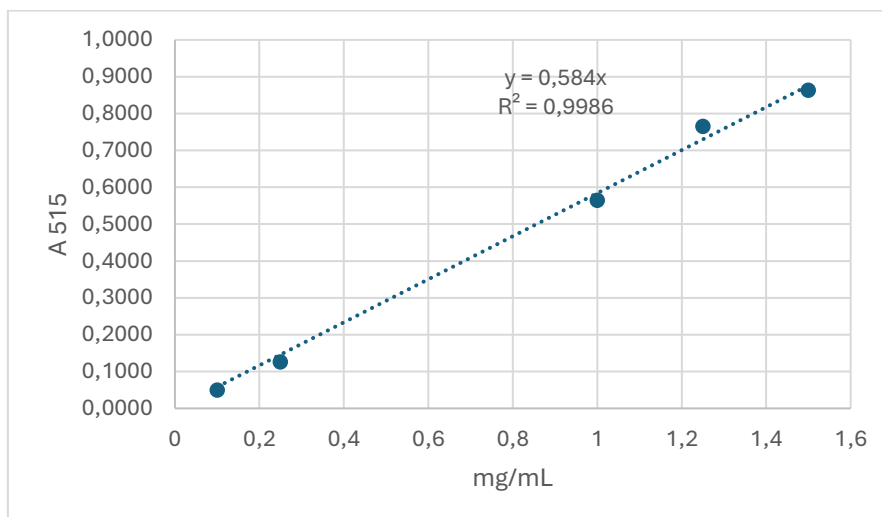


**Slika 5.** Maseni udio polifenola u ekstraktima.

Na slici 5 je prikazan je maseni udio polifenola u etanolnom ekstraktu lavande i ekstraktu lavande s NADES otapalom. Na temelju dijagrama vidi se da je u ekstraktu lavande s NADES otapalom najveći udio polifenola po g ekstrakta. Najmanji udio polifenola zabilježen je u etanolnom ekstraktu lavande. Na temelju toga možemo zaključiti da su polifenoli prisutni u ekstraktu lavande dobro ekstrahirani u NADES otapalu.

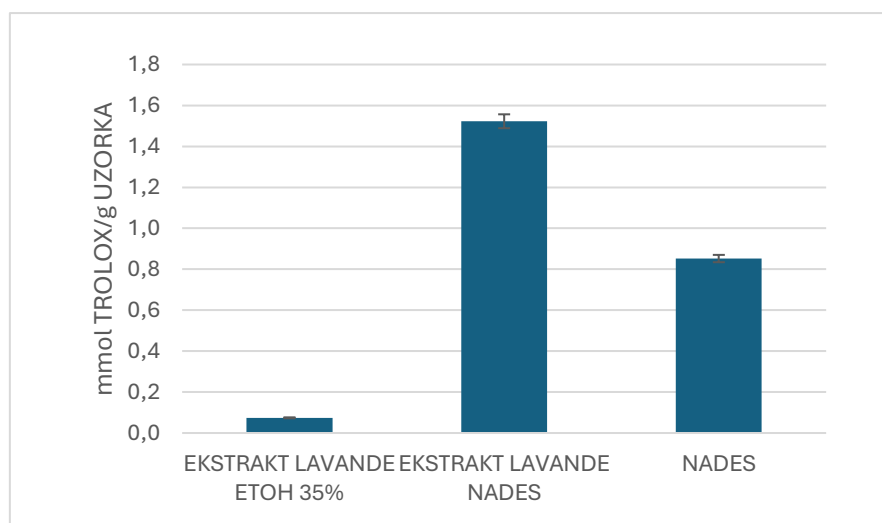
Možemo zaključiti da je zabilježen trend u ekstraktu dobivenom pomoću NADES otapala i etanola u skladu s literaturom i dosadašnjim istraživanjima (Panić i sur., 2021).

Nadalje, za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda konstruiran je pravac ovisnosti apsorbancije  $\Delta A$  o koncentraciji mM, odnosno baždarni pravac koji je prikazan na slici 3. Valna duljina na kojoj se mjerila apsorbancije bila je 515 nm te je mjerenje provedeno pet puta.



**Slika 6.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a

Jednadžba dobivenog pravca iznosi  $y = 0,584x$ , a rezultati su prikazani kao molarni udio ekvivalenta Trolox-a.

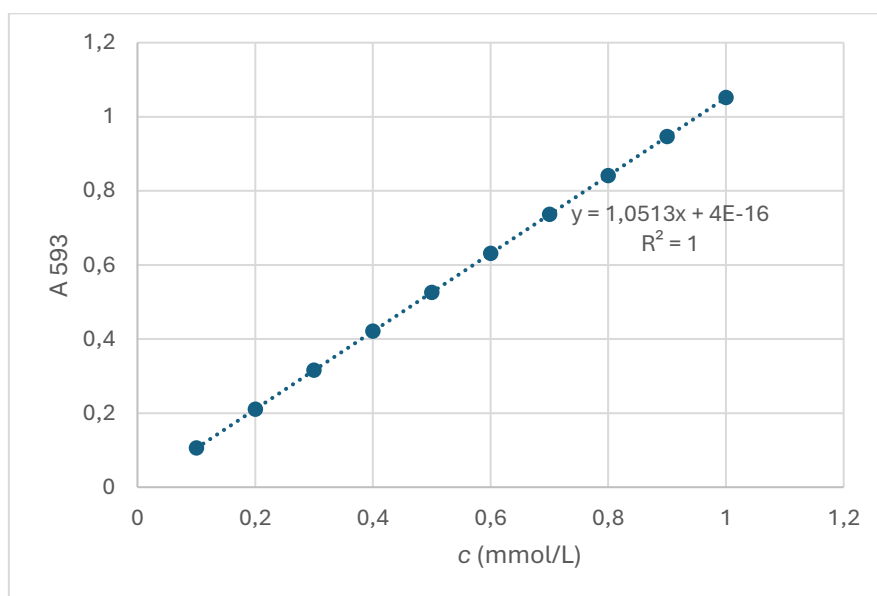


**Slika 7.** Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u uzorcima ekstrakata i NADES otapala.

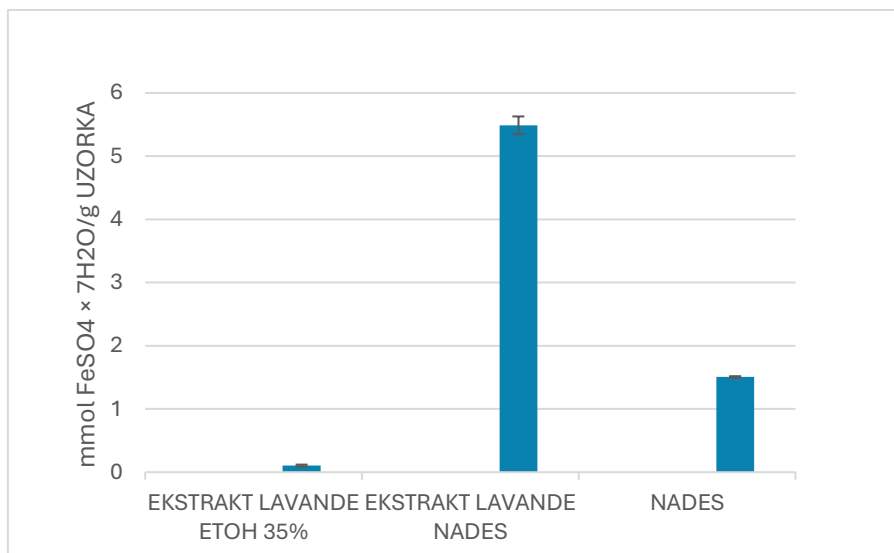


Na slici 7 koja uspoređuje izmjerenu koncentraciju Trolox-a etanolnom ekstraktu lavande, ekstraktu lavande s NADES otapalom te čistim NADES otapalom, vidljivo je da etanolni ekstrakt lavande ima najmanju koncentraciju. Nadalje, NADES otapalo ima srednju vrijednost, dok ekstrakt lavande u NADES otapalu najveću koncentraciju Trolox-a, a time i najveću antioksidacijsku aktivnost. Na temelju ovih podataka zaključuje se da je NADES otapalo puno bolje ekstrakcijsko otapalo za antioksidativne komponente ekstrakta lavande od etanola. Može se zaključiti da vrijednosti DES DPPH koreliraju s ukupnim sadržajem fenola kao što je očekivano, te su u skladu s rezultatima fenolnih ekstrakata grožđa dobivenih s DES [28]. DPPH vrijednost ekstrakta na bazi DES-a je nešto veća, što može biti posljedica utjecaja samog DES-a, odnosno spoja askorbinske kiseline koji stvara DES, a koja jedina posjeduje antioksidativno djelovanje [34]. Prethodno su ORAC vrijednosti DES određene u radovima koje su objavili Radošević i sur. (2018) i Mitar i sur. (2019) [35,36].

Kako bi odredili antioksidativnu aktivnost FRAP metodom, također je izrađen baždarni dijagram na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kao standarda.



**Slika 8.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

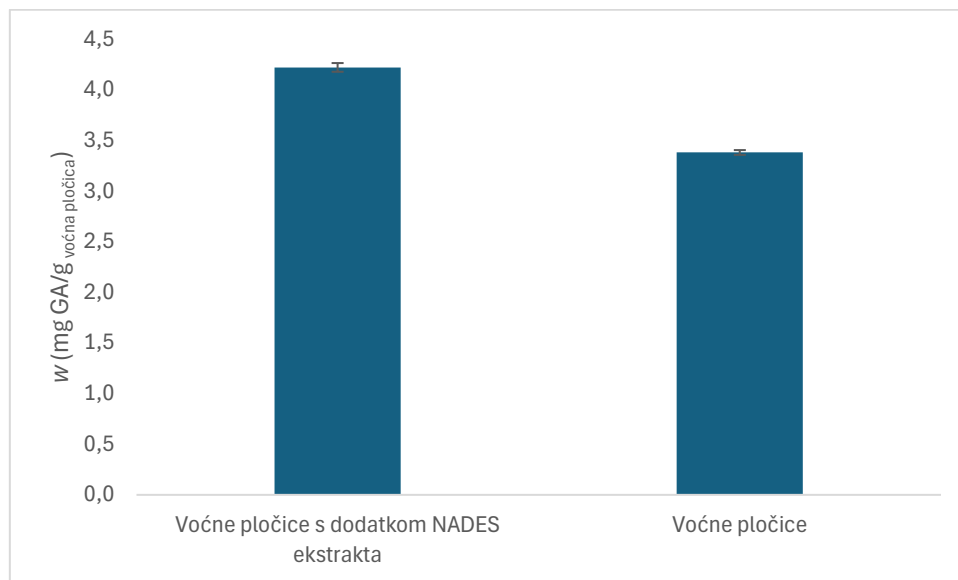


**Slika 9.** Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u uzorcima ekstrakata i NADES otapala.

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, prikazane na slici 9, pokazuju da ekstrakt lavande u etanolu ima najniži antioksidativni potencijal, NADES otapalo nešto veći, a ekstrakt lavande u NADES otapalu najveći. Možemo primijetiti kako ekstrakt lavande s NADES otapalom pokazuje najveći antioksidativni potencijal i FRAP i DPPH metodom.

## 4.2. ANTIOKSIDACIJSKA STABILNOST VOĆNIH PLOČICA I ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA

Koncentracija ukupnih polifenola određivana je u uzorcima etanolnih ekstrakata voćnih pločica na isti način kao što je opisano u poglavlju metoda 3.2.3, a dobiveni rezultati su prikazani na slici 10.

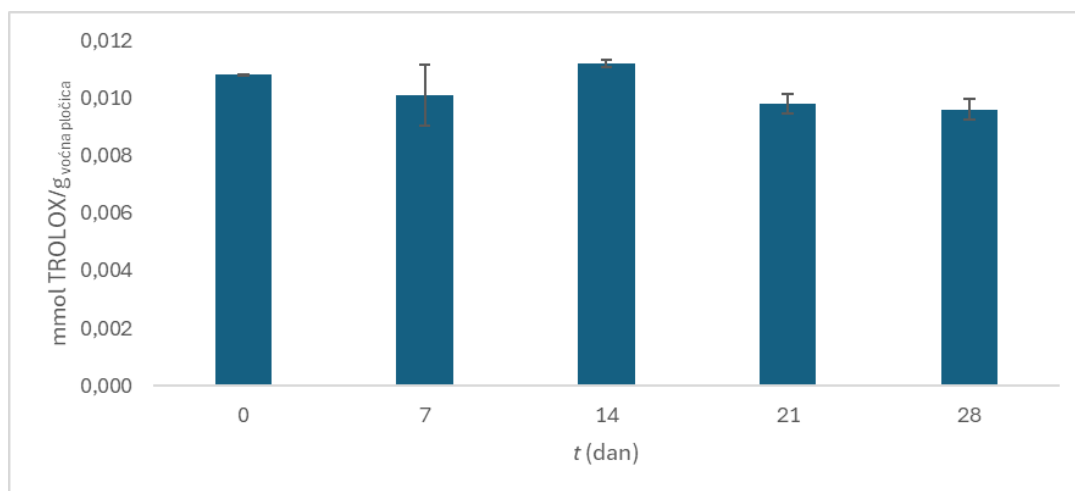


**Slika 10.** Prikaz masenog udjela polifenola u voćnim pločicama s i bez dodatka ekstrakta lavande u NADES otapalu .

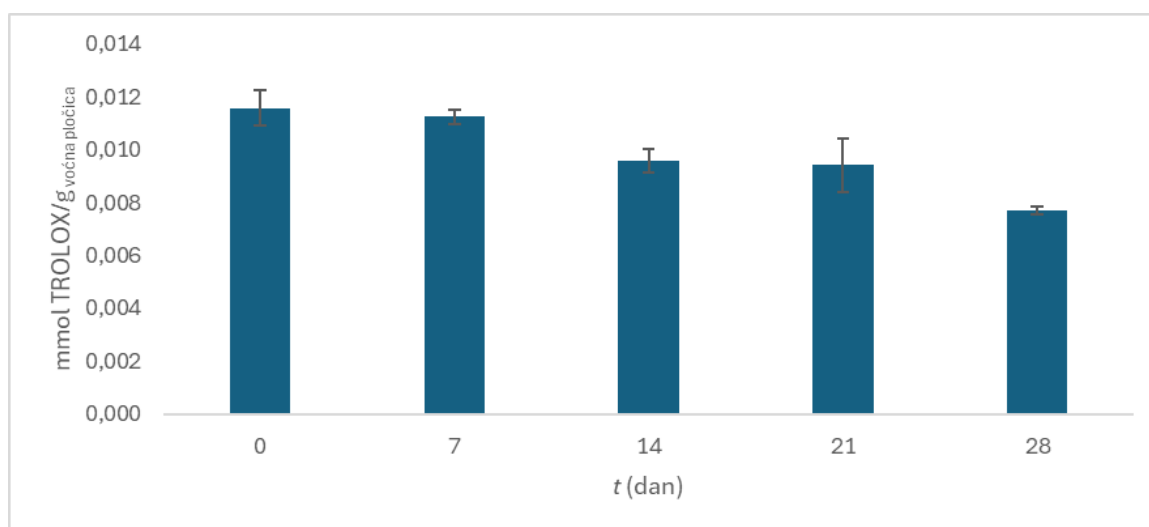
Na temelju rezultata prikazanih na slikama 10 i 11 koje prikazuju udio polifenola u etanolnim ekstraktima voćnih pločica s NADES otapalom i bez njega. Vidljivo je da etanolni ekstrakt voćne pločice koji sadrži NADES otapalo s ekstraktom lavande sadrži veći udio galne kiseline, to jest polifenola od etanolnog ekstrakta voćne pločice bez NADES otapala. Najveći udio polifenola ima uzorak etanolnog ekstrakta voćne pločice koji iznosi 4,285 mg GA/g voćne pločice. Najniži udio polifenola sadrži uzorak voćne pločice bez dodatka NADES otapala te iznosi 3,380 mg GA/g voćne pločice.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom za uzorke etanolnih ekstrakata voćnih pločica s i bez NADES otapala provedena je na isti način kao u odjeljku 3.2.3.

Na slici 11 vidljivo je da etanolni ekstrakt voćne pločice koji sadrži NADES otapalo s ekstraktom lavande sadrži veću koncentraciju Trolox-a, a samim time ima i bolja antioksidacijska svojstva od etanolnog ekstrakta voćne pločice bez NADES otapala. Najbolju antioksidativnu aktivnost pokazuje uzorak s NADES otapalom te iznosi 0,0116 mmol Trolox/g uzorka. Najnižu antioksidativnu aktivnost pokazuje uzorak s NADES otapalom te iznosi 0,0077 mmol Trolox/g uzorka.



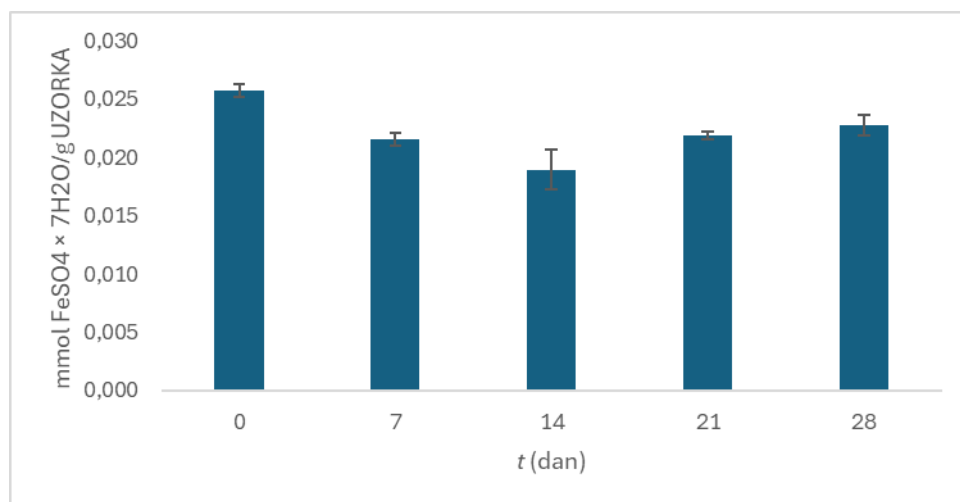
**Slika 11.** Prikaz antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u voćnim pločicama s NADES otapalom i ekstraktom lavande kroz 28 dana.



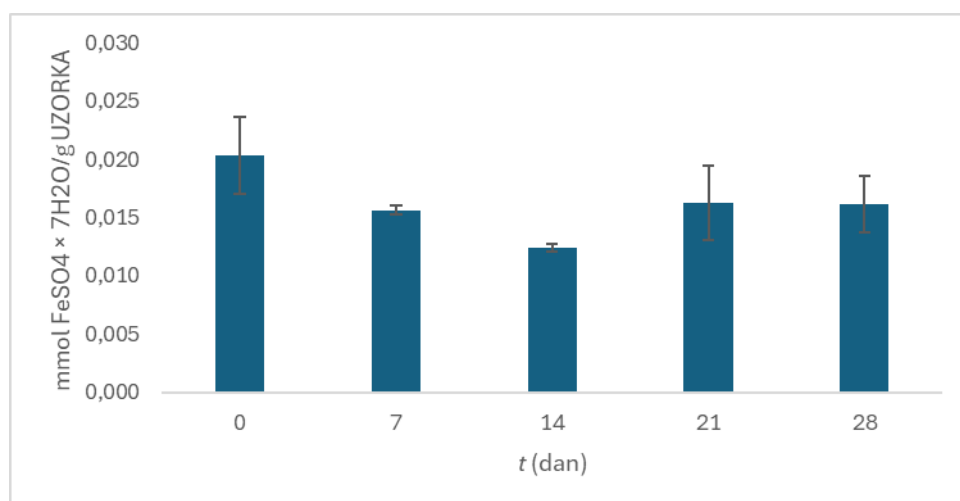
**Slika 12.** Prikaz antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u uzorku voćne pločice kroz 28 dana.

Usporedbom ova dva grafička prikaza (slika 11 i 12) vidljivo je da u ekstraktu s NADES otapalom, koncentracija Trolox-a sporije opada, te je nakon drugog mjerenja porasla, dok kod ekstrakta bez NADES otapala koncentracija Trolox-a cijelo vrijeme opada. Ovo ukazuje na bolju antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta voćne pločice s NADES otapalom i ekstraktom lavande. Isto tako, generalno je veća koncentracija Trolox-a u etanolnom ekstraktu voćne pločice s NADES otapalom i ekstraktom lavande. Uspoređujući postotak antioksidacijskog potencijala voćnih pločica pomoću DPPH metode, antioksidacijski potencijal unutar 28 dana se smanji 11,11 % u voćnim pločicama s dodatkom NADES ekstrakta i 33,62 % bez dodatka NADES ekstrakta lavande.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom za uzorke etanolnih ekstrakata voćnih pločica s i bez NADES otapala provedena je na isti način kao u odjeljku 3.2.3.



**Slika 13** . Grafički prikaz antioksidacijskog potencijala određenog FRAP metodom u voćnim pločicama s NADES otapalom i ekstraktom lavande kroz 28 dana.



**Slika 14** . Prikaz antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u uzorku voćne pločice kroz 28 dana.

Na slikama 13 i 14, koje prikazuju rezultate antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom koja opisana u poglavlju 3.2.3., vidljivo je da je veća antioksidativnost u etanolnom ekstraktu voćnih pločica s dodatkom NADES otapala i ekstrakta lavande. Također, primjetno je da antioksidativnost u ovim ekstraktima sporije opada s vremenom. Najveću

antioksidativnost pokazuje prvi uzorak etanolnog ekstrakta s NADES otapalom, te iznosi 0,0258 mmol  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /g etanolnog ekstrakta voćne pločice, dok najmanju koncentraciju ima uzorak bez NADES otapala koji iznosi 0,0124 mmol  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /g etanolnog ekstrakta voćne pločice.

Usporedbom slike 13 i slike 14 primjetno je da antioksidativnost mjerena FRAP metodom opada s vremenom u oba uzorka te nakon 14. dana mjerenja ponovo kreće rast. U uzorku s NADES otapalom je taj rast veći, što ukazuje na veću antioksidativnu stabilnost.

Postotak razgradnje za uzorke s NADES otapalom iznosi 11,63%, dok postotak razgradnje za uzorke bez NADES otapala iznosi 20,19%.

Kad uspoređujemo razgradnju prvog dana s razgradnjom posljednjeg dana, dolazi se do zaključka da je kod uzoraka s NADES otapalom 11,63% manja antioksidativnost posljednji dan, a kod uzoraka s datuljom, bez NADES otapala 20,19% je manja antioksidativnost posljednjeg dana nego prvog dana. Dakle, antioksidativnost je smanjena za 8,56% u uzorcima bez dodatka NADES otapala s ekstraktom.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovome radu pripremljeni su ekstrakti lavande u multikomponentnom NADES otapalu, te ispitani njihovi utjecaji na antioksidacijsku stabilnost u sirovim kolačima na bazi suhog voća s dodatkom komine grožđa i datulje. Iz prethodnih rezultata dolazi se do zaključaka:

1. Usporedbom ekstrakata lavande, ustanovljeno je da NADES otapalo u ekstraktu bolje ekstrahira polifenolne spojeve.
2. Prema DPPH testu, ekstrakti u NADES otapalu pokazuju veći antioksidacijski potencijal nego oni u etanolu, što je dijelom rezultat antioksidacijskog potencijala samog NADES otapala, vjerojatno zbog prisutnosti askorbinske kiseline.
3. Dodatak NADES ekstrakta lavande u voćne pločice na bazi komine grožđa pokazuje pozitivan utjecaj na antioksidacijski potencijal voćnih pločica, što je potvrđeno različitim metodama, uključujući DPPH i FRAP.
4. Uspoređujući postotak antioksidacijskog potencijala voćnih pločica pomoću DPPH metode, antioksidacijski potencijal unutar 28 dana se smanji 11,11 % u voćnim pločicama s dodatkom NADES ekstrakta i 33,62 % bez dodatka NADES ekstrakta lavande.
5. Iz rezultata mjerenja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom kod uzoraka s NADES otapalom je 11,63% manja antioksidativnost posljednji dan, a kod uzoraka s datuljom, bez NADES otapala 20,19% je manja antioksidativnost posljednjeg dana nego prvog dana. Dakle, antioksidativnost je smanjena za 8,56% u uzorcima bez dodatka NADES otapala s ekstraktom.



## 6.POPIS LITERATURE

Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B (2020) Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods* **9(11)**, 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>

Arruda HS, Pastore GM (2019) Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. *Food Research International* **123**, 450-480. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.011>

Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M (2019) Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity—a review. *International Journal of Food Science & Technology* **54(4)**, 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

Cai H, You S, Xu Z, Li Z, Guo J, Ren Z i sur. (2021) Novel extraction methods and potential applications of polyphenols in fruit waste: a review. *Journal of Food Measurement and Characterization* **15(4)**, 3250-3261. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00901-1>

Caponio GR, Noviello M, Calabrese FM, Gambacorta G, Giannelli G, De Angelis M (2022) Effects of Grape Pomace Polyphenols and In Vitro Gastrointestinal Digestion on Antimicrobial Activity: Recovery of Bioactive Compounds. *Antioxidants*, **11(3)**, 567. <https://doi.org/10.3390/antiox11030567>

Chen J, Li Y, Wang X, Liu W (2019) Application of deep eutectic solvents in food analysis: A review. *Molecules* **24(24)**, 4594. <https://doi.org/10.3390/molecules24244594>

Corrêa RC, Haminiuk CW, Barros L, Dias MI, Calhelha RC, Kato CG i sur. (2017) Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods* **36**, 410-417.

Costa JR, Amorim M, Vilas-Boas A, Tonon RV, Cabral LM, Pastrana L i sur. (2019) Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the chemical composition, bioactive properties, and cytotoxicity of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grape pomace extract. *Food & function* **10(4)**, 1856-1869. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101726>

Fontana AR, Antonioli A, Bottini R (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry* **61(38)**, 8987-9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>

Hamza AA, Heeba GH, Elwy HM, Murali C, El-Awady R, Amin A (2018). Molecular characterization of the grape seeds extract's effect against chemically induced liver cancer: In vivo and in vitro analyses. *Scientific reports* **8(1)**, 1270.

Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM i sur. (2020) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* **121(3)**, 1232–1285 <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.

Héral B, Stierlin É, Fernandez X, Michel T (2021) Phytochemicals from the genus *Lavandula*: A review. *Phytochemistry Reviews* **20**, 751-771. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09719-z>

Jaouani M, Maouni S, Ettakifi H, Mars N, Taheri FZ, El Abboudi J i sur. (2024) Molecular, biomedical and phytosanitary biodiversity of *Lavandula stoechas*: a vulnerable and underexploited medicinal plant in Morocco. *Scientific African*, **21** e02296. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02296>

Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R i sur. (2020). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical reviews in food science and nutrition* **60(15)**, 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Morgana NM, Magdalena E, de los Angeles Fernandez M, Fernanda SM (2022) NADES for food industry innovation: novel bioadditives based on olive oil byproducts. *Food and Bioproducts Processing* **134**, 193-201 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.05.007>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of molecular sciences* **22(7)**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Radojčić Redovniković I (2021) COSMOtherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready-to-use extracts from graševina grape pomace. *Molecules* **26(16)**, 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Panić M, Stojković MR, Kraljić K, Škevin D, Redovniković IR, Srček VG i sur. (2019). Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by- products. *Food chemistry* **283**, 628-636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061>

Palmelund H, Andersson MP, Asgreen CJ, Boyd BJ, Rantanen J, Löbmann K (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *International journal of pharmaceutics: X* **1**, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100034>

Punzo A, Porru E, Silla A, Simoni P, Galletti P, Roda A i sur. (2021) Grape Pomace for Topical Application: Green NaDES Sustainable Extraction, Skin Permeation Studies, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities haracterization in 3D Human Keratinocytes. *Biomolecules* **11(8)**, 1181. <https://doi.org/10.3390/biom11081181>

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala–racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **70(9-10)**, 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Sokač T, Gunjević V, Pušek A, Jurinjak Tušek A, Dujmić F, Brnčić M i sur. (2022) Comparison of Drying Methods and Their Effect on the Stability of Graševina Grape Pomace Biologically Active Compounds. *Foods* **11(1)**, 112. <https://doi.org/10.3390/foods11010112>

Torras-Claveria L, Jauregui O, Bastida J, Codina C, Viladomat F (2007) Antioxidant activity and phenolic composition of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) waste. *Journal of agricultural and food chemistry* **55(21)**, 8436-8443. <http://dx.doi.org/10.1021/jf070236n>

## Izjava o izvornosti

Ja                     Laura Tolić                     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.

---

Vlastoručni potpis



