

# Utjecaj ekstrakcijskog otapala na antioksidacijsku aktivnost nusproizvoda egzotičnog voća

---

Štargl, Otilija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:335942>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Otilija Štargl**  
0058219104

**UTJECAJ EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA NA  
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST NUSPROIZVODA EGZOTIČNOG VOĆA  
ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija voća i povrća

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj ekstrakcijskog otapala na antioksidacijsku aktivnost nusproizvoda egzotičnog voća  
Otilija Štargl, 0058219104**

**Sažetak:** Nusproizvodi egzotičnog voća predstavljaju prehrambeni otpad te se koriste kao sirovina za proizvodnju novih ili obogaćivanje postojećih proizvoda u prehrambenoj, farmaceutskoj i industriji do-dataka prehrani. Nusproizvodi avokada i banane sadrže visoke razine raznih bioaktivnih tvari koje imaju pogodan utjecaj na zdravlje, industriju i ekologiju. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcijskog otapala na antioksidacijsku aktivnost kore avokada i banane. U svrhu ispitivanja utjecaja ekstrakcijskog otapala, primijenjena su tri različita duboka eutektička otapala s 10 i 30 % vode te je uspoređena njihova učinkovitost s 30 %-tnom vodenom otopinom etanola kao primjerom konvencionalnog otapala. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su tri spektrofotometrijske metode, DPPH, FRAP i ABTS. Neovisno o metodi, kao najučinkovitija ekstrakcijska otapala su se pokazala kolin klorid i glicerol (1:3) s 30 % H<sub>2</sub>O te kolin klorid i mliječna kiselina (1:3) s 30 % H<sub>2</sub>O za ekstrakte avokada, a za ekstrakte banane ista ekstrakcijska otapala, ali s 10 % H<sub>2</sub>O. Prilikom ekstrakcije kore avokada, duboka eutektička otapala su bila podjednako učinkovita kao 30 %-tna vodena otopina etanola, dok je kod kore banane etanolni ekstrakt imao značajno nižu antioksidacijsku aktivnost. Može se zaključiti da duboka eutektička otapala imaju visok potencijal primjene u izolaciji komponenata s antioksidacijskom aktivnošću iz kore avokada i banane.

**Ključne riječi:** avokado, banana, antioksidacijska aktivnost, ekstrakcija, duboka eutektička otapala

**Rad sadrži:** 34 stranice, 5 slika, 7 tablica, 48 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:** izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Erika Dobrosravić

**Datum obrane:** npr. 12. lipnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Effect of extraction solvent on antioxidant activity of exotic fruit byproducts**

**Otilija Štargl, 0058219104**

**Abstract:** Exotic fruit by-products represent food waste and are used as raw material for the production of new or enrichment of existing products in the food, pharmaceutical and food supplement industries. Avocado and banana by-products contain a high level of various bioactive substances that have a beneficial effect on health, industry and ecology. The aim of this work was to examine the influence of the extraction solvent on the antioxidant activity of avocado and banana peels. In order to evaluate the influence of the extraction solvent, three different deep eutectic solvents with 10 and 30% water were used and their effectiveness was compared with a 30% aqueous ethanol solution as an example of a conventional solvent. Three spectrophotometric methods, DPPH, FRAP and ABTS were used to determine antioxidant activity. Regardless of the method, the most effective extraction solvents were choline chloride and glycerol (1:3) with 30% H<sub>2</sub>O and choline chloride and lactic acid (1:3) with 30% H<sub>2</sub>O for avocado extracts, and the same for banana extracts. extraction solvents, but with 10% H<sub>2</sub>O. When extracting avocado peel, deep eutectic solvents were equally effective as 30% aqueous ethanol solution, while with banana peel ethanol extract had significantly lower antioxidant activity. It can be concluded that deep eutectic solvents have a high application potential in the isolation of components with antioxidant activity from avocado and banana peels.

**Keywords:** avocado, banana, antioxidant activity, extraction, deep eutectic solvents

**Thesis contains:** 34 pages, 5 figures, 7 tables, 48 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:** Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Erika Dobroslavić, PhD

**Thesis defended:** e.g. June 12, 2021

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. EGZOTIČNO VOĆE</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. AVOKADO.....	2
2.1.2. BANANA.....	3
<b>2.2. NUSPROIZVODI PRERADE EGZOTIČNOG VOĆA</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. SASTAV KORE AVOKADA I BANANE .....	6
2.2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI KORE AVOKADA I BANANE .....	8
2.2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KORE AVOKADA I BANANE.....	9
<b>2.3. IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA</b> .....	<b>10</b>
2.3.1. KONVENCIONALNE METODE EKSTRAKCIJE .....	11
2.3.2. NAPREDNE METODE EKSTRAKCIJE .....	12
2.3.3. ODABIR EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA ZA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH SPOJEVA .....	13
2.3.3.1. KONVENCIONALNA OTAPALA .....	13
2.3.2. DUBOKA EUTEKTIČKA OTAPALA (DES) .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>16</b>
3.1.1. UZORCI .....	16
3.1.2. PRIBOR I OPREMA .....	16
3.1.1. KEMIKALIJE I STANDARDI.....	16

<b>3.2. METODE</b> .....	<b>19</b>
3.2.1. PRIPREMA DES OTAPALA .....	19
3.2.2. POSTUPAK EKSTRAKCIJE .....	19
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM.....	20
3.2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM .....	21
3.2.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ABTS METODOM.....	21
3.2.6. STATISTIČKA ANALIZA .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>26</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>29</b>

## 1. UVOD

Zbog unaprjeđenja tehnika skladištenja i transporta, marketinških aktivnosti te širenja svijesti potrošača o dobrobitima za zdravlje, konzumacija i prerada egzotičnog voća u porastu je u cijelome svijetu. Egzotično voće je bogato bioaktivnim spojevima, poput fenolnih spojeva, karotenoida, vitamina i dijetalnih vlakana. Međutim, industrija prerade voća generira u velikom postotku nusproizvode, kao što su kore, sjemenke i pulpe koje zaostaju u različitim fazama lanca prerade. U većini slučajeva otpadni nusproizvodi mogu sadržavati sličan ili čak veći sadržaj bioaktivnih spojeva nego konačni proizvod (Ayala-Zavala i sur., 2011). Nusproizvodi avokada i banane su bogati izvori ugljikohidrata, lipida, proteina, vlakana, minerala i drugih bioaktivnih spojeva od kojih se ističu hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzojeve kiseline, organske kiseline, flavonoidi, terpenoidi, alkaloidi, saponini i drugi polarni i nepolarni spojevi (Araujo i sur., 2018). Kemijski sastav, najčešće odbačenih, nusproizvoda avokada i banane ukazuje na bogate izvore bioaktivnih komponenti koje imaju vrlo važne nutritivne, zdravstvene i farmaceutске učinke. Kora banane se tradicionalno koristi kao medicinski materijal za liječenje raznih bolesti kao što su opekline, anemija, proljev, čirevi, upale, dijabetes, kašalj, zmijski ugriz i prekomjerna menstruacija (Vu i sur., 2018). Nadalje, fenoli u avokadu i banani zabilježeni u kori pokazuju antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, a to je usko povezano sa zdravstvenim prednostima. Kako bi se iskoristio potencijal vrijednih sastojaka kore avokada i banane, važno je provesti učinkovitu ekstrakciju bioaktivnih spojeva, na što osim tehnike, uvelike utječe i odabir otapala. U novijim istraživanjima duboka eutektička otapala (DES) pokazala su se kao ekstrakcijska otapala s boljom učinkovitošću od konvencionalnih otapala, poput etanola, metanola, vode. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati nekoliko različitih DES-ova te odrediti njihov utjecaj na ekstrakciju bioaktivnih spojeva kore avokada i banane. Korištena su tri različita DES-a: kolin klorid i glicerol (1:3), kolin klorid i mliječna kiselina (1:3) i kolin klorid i fruktoza (1:1,9) s različitim udjelima vode (10 i 30 %) te su uspoređena s 30 %-tnom vodenom otopinom etanola kao primjerom konvencionalnog otapala. Učinkovitost navedenih otapala utvrđena je određivanjem antioksidacijske aktivnosti ekstrakata kore avokada i banane primjenom tri spektrofotometrijske metode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. EGZOTIČNO VOĆE

Egzotično voće je botanički raznolika vrsta koja se uzgaja i raste u tropskim područjima. Većina egzotičnog voća jestiva je i cijenjena zbog svog jedinstvenog okusa i senzorskih kvaliteta. Samim time, posljednjih godina lanac proizvodnje, transporta i marketinga se strahovito povećao. Najpoznatije i najčešće korišteno egzotično voće su avokado, banana, kivi, grejp, jojoba, kokos i limeta.

Europska klima nije previše pogodna za uzgoj tropskog voća i povrća pa se ovi proizvodi u većini slučajeva uvoze. Neke zemlje proizvode vrlo male količine kao što su Španjolska i Portugal, ali to je zanemarivo u odnosu na ukupnu potrošnju egzotičnog voća i povrća u EU. Provedba rada, dobiveni rezultati kao i izvedeni zaključci, temelje se na dvije vrste egzotičnog voća korištenih kao primjer. Te dvije vrste su avokado i banana.

Prema podacima FAO (2024) Sjeverna Amerika je glavni izvoznik avokada, jednog od najpoznatijeg egzotičnog voća, čineći čak 46 % ukupnih svjetskih uvoza avokada. Prate ju Europa s 35,5 % i Azija s 9,8 %. Glavni izvoznici banane su Središnja i Južna Amerika te Filipini (više od 90 %), a najveći uvoznici su EU, SAD, Rusija i Japan.

#### 2.1.1. Avokado

Avokado (*Persea americana* Mill.) je zimzelena biljka koja pripada porodici Lauraceae (slika 1). Kruškolikog je oblika i dug je 7-20 cm, težine od 100 do 1000 g te ima veliku središnju košticu (dužine 5–6,4 cm). Plod je bogat nezasićenim mastima i vitaminima, a botanički je klasificiran kao bobica koja se sastoji od koštice i perikarpa, koji je sastavljen od kore ili egzokarpa, mesa ili mezokarpa i tankog sloja pored ovojnice koštice, endokarpa. Egzokarp se sastoji od kutikule, epiderme, parenhima i sklerenhima ili kamenih stanica koje ograničavaju unutarnju površinu kore, dok je mezokarp sastavljen od velikih izo-dijametričnih stanica parenhima koje sadrže lipide i prožet je vaskularnim sustavom (Seymour i sur., 1993). U svijetu postoji oko 500 sorti avokada koje se razlikuju po obliku i boji ploda, ali okus se gotovo ne mijenja. Avokado je dostupan ljudima gotovo cijele godine (svibanj-veljača). Pulpa avokada sadrži oko 30 % masti, bjelančevine, kalcij, željezo, veliki broj lako probavljivih masti, mineralne soli i vitamine E, B1, B2 i D. Avokado pozitivno utječe na kratkoročno pamćenje i smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti te je bogat serotoninom 5-hidroksitriptaminom (5-HT) koji je monoaminski neurotransmitter (Feldman i Lee, 1985).





**Slika 1.** Stablo i plod avokada (Anonymous 1)

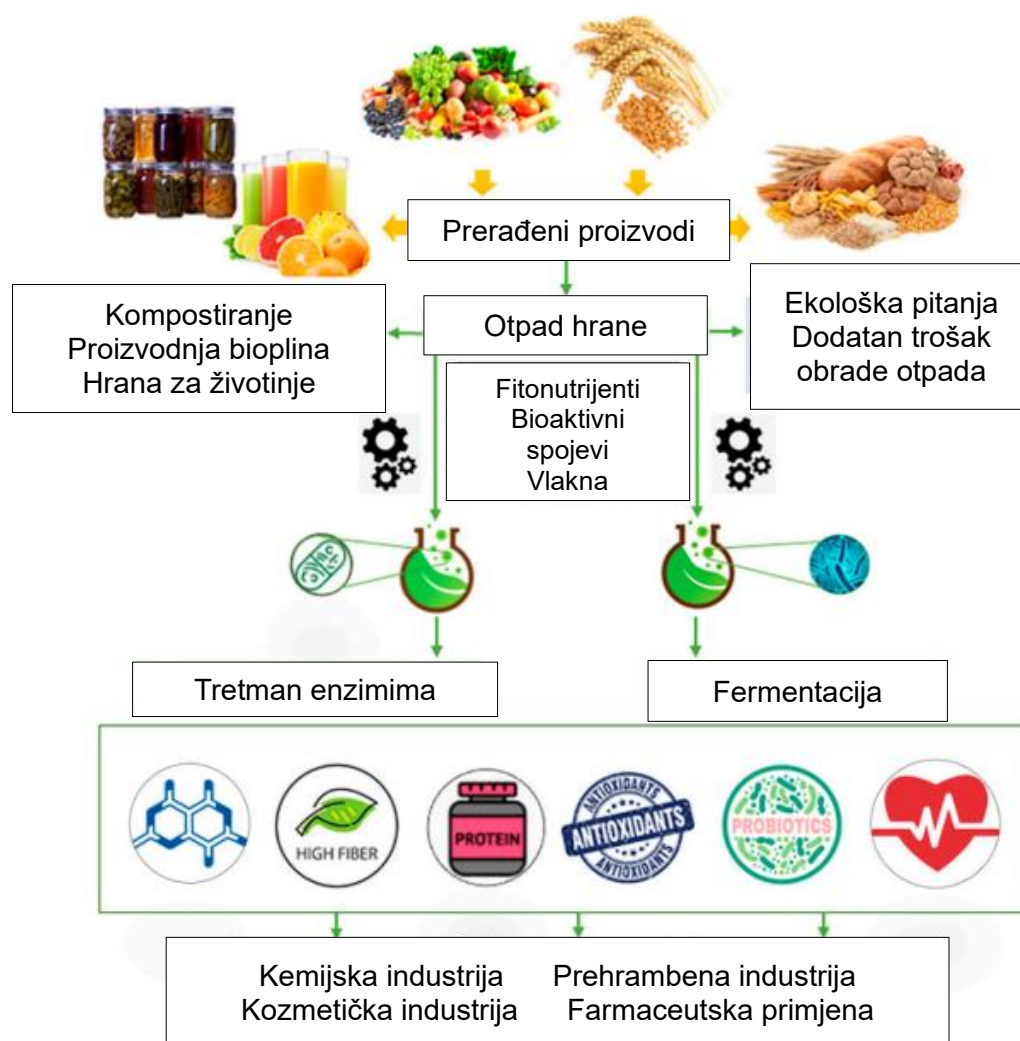
### 2.1.2. Banana

Banane (*Musa acuminata*) su jednosupnice i pripadaju porodici Musaceae. One su stablolike višegodišnje zeljaste biljke, visine od dva do devet metara, s podzemnim rizomom ili korijenom, pseudostabljikom sastavljenom od ovojnica lista i završnom krunicom lišća kroz koju izbija cvat (slika 2). Sedam do devet mjeseci nakon sadnje izdanka iz korijena, cvat se formira na dnu pseudostabljike. Otprilike mjesec dana kasnije, taj cvat izlazi, a plodovi mogu biti pogodni za berbu 90-150 dana nakon nicanja cvatova. Plod banane svrstava se u bobičasto voće (Seymour i sur., 1993). Gotovo svi dijelovi ove biljke (kora, list, pseudostabljika, stabljika i cvijet) mogu se iskoristiti. Moguće ih je iskoristiti kao bojilo, aromu, izvor makro i mikro-nutrijenata, hranu za stoku, izvor vlakana i bioaktivnih komponenti. Uz sve navedeno, banana ima široku primjenu u medicini. Kuhani cvijet koriste dijabetičari te ljudi koji boluju od bronhitisa, čira i dizenterije. Pseudostabljika može se koristiti za ubode i opekline, a za iritaciju kože list (Jideani i Anyasi, 2020).



**Slika 2.** Stablo i plod banane (Anonymous 2)

## 2.2. NUSPROIZVODI PRERADE EGZOTIČNOG VOĆA



**Slika 3.** Grafička ilustracija upotrebe nusproizvoda voća, povrća i žitarica (prema Tlais i sur., 2020)

Egzotično voće konzumira se u svježem stanju, ali se i prerađuje u različite proizvode poput sokova, džemova, kompota, voćnih želea ili sušenih proizvoda. Potrošnja egzotičnog voća u bilo kojem obliku generira određene nusproizvode poput kore, komine, sjemenke/koštice, stabljike i lišća. Ti nusproizvodi najčešće predstavljaju prehrambeni otpad te time povisuju troškove proizvodnje i uzrokuju probleme kod njihovog zbrinjavanja. No, posljednjih godina raste trend kružne ekonomije i održivog gospodarjenja otpadom od hrane zbog čega se takvi nusproizvodi koriste kao sirovina za proizvodnju novih ili obogaćivanje postojećih proizvoda u prehrambenoj, farmaceutskoj i industriji dodataka prehrani kao što je prikazano na slici 3. Prijavljeno je da nusproizvodi egzotičnog voća sadrže visoke razine raznih bioaktivnih tvari koje imaju pogodan utjecaj na zdravlje, a mogu se ekstrahirati iz nusproizvoda kako bi se dobili nutraceutici (Gorinstein i sur., 2011). Avokado se uglavnom konzumira svjež, ali se također prerađuje za proizvodnju ulja i drugih proizvoda. Kora i sjemenke dio su avokada koji se obično

ne koriste te se odbacuju, što ih čini izvorom onečišćenja okoliša. Međutim, navedene komponente bogate su proteinima, vlaknima i brojnim bioaktivnim spojevima (Rodríguez Carpena i sur., 2011). Prema istraživanjima, 39,6 do 42,4 % avokada završi kao odbačeni nusproizvod pa bi pronalaženje alternativa za njihovo korištenje smanjilo otpad i ekološke probleme i stvorilo važne prehrambene, zdravstvene i industrijske koristi. Nekoliko je primjera uspješnih pristupa iskorištavanju otpada iz prerade avokada. Industrijski organski otpad avokada iz proizvodnje ulja transformiran je u potencijalni konzervans, koji je uspješno inhibirao lipidnu oksidaciju u svinjskim kobasicama (Permal i sur., 2020). Nadalje, ekstrakti sjemenki i kore inhibirali su oksidativne reakcije i zaustavili degradaciju boje tijekom skladištenja (pri 4 °C tijekom 15 dana) sirovih svinjskih pljeskavica, smanjenjem TBARS (tiobarbiturne kiseline) i stvaranjem proteinskih karbonila (Rodríguez Carpena i sur., 2011). U slučaju banane, nusproizvodi uključuju pseudostabljkicu, lišće, cvat, stabljiku ploda, rizom i koru. Većina ovih nusproizvoda je podcijenjena roba s ograničenom komercijalnom vrijednošću i njihova primjena se u nekim slučajevima smatra ekonomskim gubitkom. Pseudostabljkica i lišće se obično ostavljaju na farmama da istrunu i obnove hranjive tvari u tlu. Listovi banane još uvijek se koriste kao materijali za omatanje tradicionalne hrane u jugoistočnoj Aziji, ali njihova primjena ograničena je samo na neke etničke namirnice (Akinyele i Agbro, 2007).

#### 2.2.1. Sastav kore avokada i banane

**Tablica 1.** Kemijski sastav kore avokada Hass sorte (% w w<sup>-1</sup>) (prema Bressani i sur., 2009).

Kemijski sastav	Kora avokada (% w w <sup>-1</sup> )
Sadržaj vlage	7,66
Minerali	3,85
Lipidi	5,52
Vlakna	3,98
Proteini	3,44
Ugljikohidrati	79,54

U tablici 1 mogu se vidjeti rezultati istraživanja Bressani i sur. (2009) koji su prikazali kemijski sastav kore avokada Hass sorte. Može se uočiti kako kora avokada ima najveći udio ugljikohidrata od svih ostalih sastojaka (79,54 %, w w<sup>-1</sup>). Proteini, vlakna, lipidi i minerali imaju sličan udio u kori (3,44; 3,98; 5,52; 3,85 %, w w<sup>-1</sup>).

**Tablica 2.** Mineralni sastav kore i koštice avokada (%) (prema García-Vargas i sur., 2020).

<b>Element</b>	<b>Kora avokada (%)</b>	<b>Koštica avokada (%)</b>
Dušik	0,97 ± 0,07	0,66 ± 0,01
Kisik	42,2 ± 2,62	50,79 ± 1,56
Vodik	5,71 ± 0,02	5,58 ± 0,02
Ugljik	49,83 ± 0,42	42,05 ± 0,05
Pepeo	3,81 ± 0,05	2,76 ± 0,28
Vlažnost	70,9 ± 0,2	52,0 ± 0,4

U tablici 2 prikazan je mineralni sastav kore i koštice avokada. Vidljivo je da kora i koštica imaju sličan mineralni sastav, ali kora sadržava nešto veće udjele dušika i kisika (García-Vargas i sur., 2020).

**Tablica 3.** Kemijski sastav kore banane (%) (prema Tsado i sur., 2021).

<b>Kemijski sastav</b>	<b>Kora banane (%)</b>
Sadržaj vlage	9,83 ± 0,03
Pepeo	9,56 ± 0,06
Protein	3,23 ± 0,05
Vlakna	12,67 ± 0,08
Masti	0,89 ± 0,04
Ugljikohidrati	63,82 ± 0,32

Tsado i sur. (2021) su prikazali kemijski sastav kore banane (tablica 3) gdje se ističe visok udio ugljikohidrata (63,82 %). Može se uočiti kako je banana sa svojim visokim udjelom ugljikohidrata slična avokadu, a isto tako imaju i sličan udio proteina. Veća razlika može se vidjeti u udjelu vlakna gdje banana ima nešto veći (12,67 %), a avokado manji (3,98 %).

**Tablica 4.** Mineralni sastav kore banane (mg 100 g<sup>-1</sup>) (prema Tsado i sur., 2021).

Element	Kora banane (mg 100 g <sup>-1</sup> )
Bakar	1,35 ± 0,05
Željezo	5,06 ± 0,07
Mangan	10,38 ± 0,04
Cink	11,60 ± 0,03
Kalcij	17,85 ± 0,25
Magnezij	49,32 ± 0,74
Natrij	58,16 ± 2,73
Kalij	38,22 ± 0,16
Fosfor	22,64 ± 0,38

Mineralni sastav kore banane prikazan je u tablici 4 iz koje možemo primijetiti najveću zastupljenost magnezija i kalcija, dok najmanje ima bakra i željeza.

#### 2.2.2. Bioaktivni spojevi kore avokada i banane

Glavni bioaktivni spojevi opisani u pulpi avokada i njegovim nusproizvodima (kora, sjemenke i list) su polifenoli nakon kojih slijede karotenoidi, tokoferoli i steroli. Polifenoli su raspoređeni u pulpi, kori, sjemenu i lišću, dok se karotenoidi i tokoferoli nalaze uglavnom u pulpi avokada.

Avokado pokazuje visok sadržaj flavonoida koji se mogu naći u pulpi, sjemenki ili kori. Identificirano je 15 glavnih spojeva u kori, 11 procijanidina, dimera i trimera u različitim izomernim oblicima. Glavni flavonoidi prisutni u kori avokada su epikatehin (0,02 mg g<sup>-1</sup>) i hesperidin (0,01 mg g<sup>-1</sup>). Osim toga, pronađene su i fenolne kiseline kao što su kafeinska kiselina (0,2 mg g<sup>-1</sup>), kumarinska kiselina (0,1 mg g<sup>-1</sup>) i ferulinska kiselina (0,01 mg g<sup>-1</sup>). Sjemenka avokada također je pokazala prisutnost flavonoida (katehin 1,02 mg g<sup>-1</sup> s.tv.) i drugih neflavonoidnih fenola uključujući klorogensku kiselinu, kafeinsku kiselinu i ferulinsku kiselinu s vrijednostima 0,75, 0,22 i 0,01 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Studije su potvrdile prisutnost još 11 spojeva u sjemenki avokada, uključujući tirozol glukozid (2,23 mg g<sup>-1</sup>), 1-kafeoilkinu kiselinu (1,12 mg g<sup>-1</sup>) i hidroksi-tirozol glukozid (0,39 mg g<sup>-1</sup>), dok su za pulpu navedeni fenolni spojevi kao što je glukozid *p*-kumarinske kiseline (0,08 mg g<sup>-1</sup>), 5-feruloilkina kiselina (0,05 mg g<sup>-1</sup>) i *p*-

kumarinska kiselina ( $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Sáyago-Ayerdi i sur., 2021).

Banana je dobar izvor antioksidansa visoke nutritivne vrijednosti. Glavni biokemijski spojevi prisutni u banani su fenoli, karotenoidi, flavonoidi i biogeni amini. Stoga se za banane kaže da imaju višu razinu antioksidativnog kapaciteta od nekog drugog voća kao što su limun, lubenica, rajčica ili nektarina. Kora banane čini otprilike 40 % težine banane i ima najveću koncentraciju flavonoida. Trenutno postoji više od 40 polifenolnih spojeva koji su identificirani. Flavonoidi su najdominantniji oblici, gdje se ističu katehini, epikatehini ( $1,14 \text{ mg g}^{-1}$ ), galokatehini ( $5,91 \text{ mg g}^{-1}$ ) i antocijani te među fenolnim kiselinama galna kiselina ( $3,86 \text{ mg g}^{-1}$ ). Otkriveno je i da su epikatehin, galokatehin i miricetin-3-O-ramnozil glikozid flavonoidi s najvećom koncentracijom u zreloj banani (Sáyago-Ayerdi i sur., 2021).

### 2.2.3. Antioksidacijska aktivnost kore avokada i banane

Za procjenu sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i ukupne antioksidacijske aktivnosti (AOA) jednog spoja i/ili složenih smjesa, kao što su biljke, hrana i biološki uzorci, koristi se nekoliko metoda. **DPPH metoda** razvijena je za određivanje AOA spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH radikal zbog nesporenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra ( $517 \text{ nm}$ ) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesporenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001). **ABTS metoda** se temelji na sposobnosti molekula antioksidansa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ). U prisutnosti antioksidansa stabilni  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Metoda određivanja AOA **FRAP metodom** temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri  $593 \text{ nm}$  (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko  $\text{FeSO}_4$ , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Lyu i sur. (2023) su određivali AOA kore, pulpe i koštice Hass avokada primjenom FRAP, DPPH i ABTS metoda. Neovisno o primijenjenoj metodi, najviša AOA je određena u kori avokada rezultirajući vrijednostima  $75,77$ ;  $71,03$  i  $3,05 \text{ mg}$  ekvivalenta askorbinske kiseline  $\text{g}^{-1}$  ( $\text{mg AAE g}^{-1}$ ) određenim ABTS, DPPH i FRAP metodom. Nešto niže vrijednosti su određene istim

metodama u koštici avokada (74,14; 47,97; 0,98 mg AAE g<sup>-1</sup>), dok je sama pulpa avokada imala najnižu AOA.

Vinha i sur. (2013) su DPPH metodom određivali AOA u kori, pulpi i koštici avokada, odnosno vodenim ekstraktima koncentracije 0,1 i 0,2 mg mL<sup>-1</sup> te su dobili nešto drukčije rezultate. Pulpa je u oba slučaja pokazala najveću AOA (40-50 %). Kora je pokazala aktivnost od 30 do 40 %. Koštica je imala sličnu aktivnost kao kora u 0,2 mg mL<sup>-1</sup> ekstraktu, a u drugom nešto manju (20-30 %).

Bashmil i sur. (2021) su određivali AOA kore i pulpe zrele Cavendish sorte banane primjenom FRAP, DPPH i ABTS metoda. Određena AOA je znatno manja od avokada neovisno o metodi. Kora banane ima nešto veće vrijednosti od pulpe (1,28; 0,67; 2,41 mg AAE g<sup>-1</sup>), dok pulpa banane ima slične vrijednosti kao pulpa avokada.

Maduwanthi i Marapana (2021) su proveli određivanje AOA banane (*M. acuminata*) primjenom DPPH, FRAP i ABTS metodom u mg Trolox ekvivalenta 100 g<sup>-1</sup> (TE 100 g<sup>-1</sup>) te su najveću vrijednost dobili ABTS metodom (1422,27 TE 100 g<sup>-1</sup>) koju je slijedio iznos 640,91 TE 100 g<sup>-1</sup> za DPPH metodu, a značajno manju dobili su primjenom FRAP metode (18,28 TE 100 g<sup>-1</sup>).

### 2.3. IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je ključni prvi korak u analizi biljaka jer je potrebno ekstrahirati željene kemijske komponente iz biljnog materijala za daljnje odvajanje i karakterizaciju. Osnovna operacija uključuje korake kao što su prepranje, sušenje biljnog materijala ili liofilizacija, usitnjavanje u svrhu homogenizacije uzorka i pospješivanja ekstrakcijske kinetike kao i povećanja površine kontakta uzorka sa sustavom otapala. Ispravne radnje moraju biti poduzete kako bi se osiguralo da se potencijalni aktivni sastojci ne izmijene ili degradiraju tijekom pripreme ekstrakta iz uzoraka biljaka (Fabricant i Farnsworth, 2001).

Odabir otapala uvelike ovisi o specifičnoj prirodi ciljanog bioaktivnog spoja. Ekstrakcija hidrofilnih spojeva koristi polarna otapala kao što su metanol, etanol ili etil-acetat. Za ekstrakciju lipofilnih spojeva koriste se diklorometan ili smjesa diklorometana i metanola u omjeru 1:1. U nekim se slučajevima za izolaciju karotenoida koristi ekstrakcija heksanom (Cos i sur., 2006). Pojavile su se brojne publikacije o izolaciji i frakcioniranju fenolnih spojeva tijekom protekla dva desetljeća. Tradicionalne metode za pripremu uzoraka, odvajanje, detekciju i identifikaciju sve se češće zamjenjuju naprednim tehnikama. Na odluku o metodi ekstrakcije utječu kemijska priroda tvari, čestice uzorka veličinom te prisutnost ometajućih tvari, a na sam prinos ekstrakcije utječe vrijeme ekstrakcije, temperatura, otapalo, broj ciklusa ekstrakcije te izbor ekstrakcijskog otapala (Brglez Mojzer i sur., 2016).



Ekstrakcija biljnog materijala može se vršiti različitim metodama. Razlikujemo konvencionalne i nekonvencionalne metode. Konvencionalne metode široko su prihvaćene zbog jednostavne upotrebe, učinkovitosti i široke primjenjivosti. Nekonvencionalne metode ekološki su prihvatljivije zbog smanjene upotrebe sintetičkih i organskih kemikalija, smanjenog vremena rada te boljeg prinosa i kvalitete ekstrakta.

### 2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Konvencionalne metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala podrazumijevaju klasične tehnike zbog jednostavne upotrebe, učinkovitosti i široke primjenjivosti. Takve metode uključuju upotrebu uobičajenih otapala poput alkohola (metanol, etanol), acetona, dietil etera i etil acetata, često pomiješanih s različitim omjerima vode (Brglez Mojzer i sur., 2016). Za dobivanje bioaktivnih spojeva iz biljaka, najčešće korištene klasične tehnike su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i hidrodestilacija.

**Soxhlet ekstrakcija** razvijena je 1879. i od tada se još uvijek smatra kao referentna metoda za procjenu učinkovitosti drugih novih postupaka ekstrakcije. Soxhlet ekstrakcija nudi određene prednosti u odnosu na druge tehnike. Konstantan protok svježeg otapala u uzorak poboljšava pomicanje ravnoteže prijenosa koja pogoduje ekstrakciji spojeva. Održani toplinski učinak na uzorak, konačni ekstrakt koji ne zahtijeva filtraciju i obrada više uzoraka paralelno uz relativno niske troškove i jednostavne operativne procese. Međutim, ova tehnika ima neke nedostatke budući da ekstrakcija zahtijeva dugotrajno korištenje velike količine otapala na točki vrenja koja bi mogla razgraditi ekstrahirane visokovrijedne spojeve. Štoviše, ova dugotrajna tehnika se ne može ubrzati miješanjem, a organska otapala korištena u ekstrakciji morat će se ukloniti iz konačnog proizvoda isparavanjem, uzrokujući ekonomske i ekološke rizike (Wang i Weller, 2006).

**Maceracija** je široko korištena tehnika ekstrakcije čvrste tvari kojom se postiže ekstrakcija visokovrijednih spojeva odabirom polarnosti otapala i primjenom topline i/ili miješanja kako bi se povećala topljivost spojeva od interesa iz uzorka. Maceracija se može izvesti pomoću jeftine opreme koja je jednostavna za rukovanje u usporedbi s drugim konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije. Štoviše, protokoli maceracije mogu se prilagoditi za ekstrakciju širokog spektra. Glavni nedostaci maceracije su dugo vrijeme ekstrakcije i velike količine upotrijebljenog otapala (Sasidharan i sur., 2018).

**Hidrodestilacija** je tradicionalna metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva i eteričnih ulja iz biljaka. Organska otapala nisu uključena i može se izvesti prije dehidracije biljnih materijala. Postoje tri vrste hidrodestilacije: destilacija vodom, destilacija vodenom parom te izravna destilacija parom (Vankar, 2004).

### 2.3.2. Napredne metode ekstrakcije

Zbog problema povezanih s visokim temperaturama obrade i dugim vremenima obrade u konvencionalnim postupcima ekstrakcije, postoji potreba za promicanjem razvoja i primjenu alternativnih tehnika ekstrakcije fenolnih spojeva. Moguće alternative predstavljaju ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija superkritičnim fluidom koje su nedavno dobile visoku vrijednost zbog svoje jednostavnosti, kraćeg vremena ekstrakcije i smanjene potrošnje organskog otapala (Brglez Mojzer i sur., 2016).

**Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)** je jednostavna, ekološki prihvatljiva i ekonomična tehnika za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz različitih biljnih materijala. Princip zagrijavanja kod MAE se temelji na direktnom djelovanju mikrovalova na ciljane molekule. Ionska kondukcija i rotacija dipola u otapalu i matriksu uzorka su mehanizmi zaslužni za transformaciju elektromagnetske energije u toplinsku. Ionska kondukcija događa se uslijed elektroforetske migracije iona pod utjecajem elektromagnetskog polja. Zbog sudara među molekulama dolazi do promjene smjera gibanja iona, a mijenjanjem magnetskog polja dolazi do frikcije, samim time i do grijanja otopine. Nadalje, rotacija dipola povezana je s dodatnim gibanjem polarnih molekula koje sadrže dipolne momente koji se pokušavaju uskladiti s nametnutim elektromagnetskim poljem. Entropija sustava se povećava kako se električno polje smanjuje, a to rezultira oslobađanjem topline (Mirković, 2016).

**Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)** uključuje primjenu visoko intenzivnih, visokofrekventnih zvučnih valova i njihovu interakciju s materijalima. UAE je potencijalno korisna tehnologija jer ne zahtijeva složene instrumente i relativno je niskog troška. Ultrazvučni valovi se postižu serijom kompresije i razrjeđivanja valova u mediju kroz koji prolaze, a tako se stvaraju longitudinalni valovi koji uzrokuju stvaranje ekspanzivnih vrtloga. Mala količina plina iz medija ulazi u nastale mjehuriće tijekom ekspanzije, ali ne izlazi u potpunosti tijekom kompresije. Time mjehurići rastu i na kraju pucaju (kavitacija). Pucanjem mjehurića se proizvodi energija koja djeluje na staničnu stjenku uzorka koji je podvrgnut ekstrakciji. Kavitacija mehanički oštećuje staničnu stjenku čime se olakšava pristup otapala staničnom sadržaju i poboljšava prijenos mase (Lončarić, 2022).

**Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE)** predstavlja izvrsnu alternativu klasičnim metodama ekstrakcije zbog brojnih prednosti superkritičnog fluida, kao što su bolja difuzija, niža viskoznost, manja površinska napetost, visoka selektivnost, kontrola otapajuće moći promjenom tlaka i temperature te jednostavno uklanjanje fluida iz dobivenog ekstrakta. Ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) se najčešće koristi kao superkritični fluid jer je netoksičan, nezapaljiv,

neeksplozivan, nekorozivan, lako dostupan, jeftin, bez mirisa i boje, s kritičnom temperaturom od 31,1 °C. SFE je metoda prijenosa tvari koja se temelji na činjenici da određeni plinovi postaju izuzetno dobra otapala za specifične kemijske spojeve u blizini svoje kritične točke, tj. u superkritičnom području, gdje se fluid podvrgava tlaku i temperaturi blizu ili iznad kritične točke kako bi se poboljšala snaga otapanja mobilne faze (Aladić, 2015).

### 2.3.3. Odabir ekstrakcijskog otapala za izolaciju bioaktivnih spojeva

Ključna svojstva za odabir otapala prilikom izolacije ciljanih spojeva su cijena, moć otapala (parametri topljivosti), hlapljivost, viskoznost, sigurnost (pri rukovanju, eksplozivnost, korozivnost), toksičnost, utjecaj na okoliš, sposobnost miješanja s vodom, stabilnost (kemijska i fizikalna), sastav (miris, boja, čistoća i vrsta/količina nečistoća) te gustoća. Uz sva navedena svojstva, postoje još neka koja su tražena prilikom odabira, a to su električna svojstva (dielektrična konstanta i električna vodljivost), indeks loma, površinska napetost, temperatura vrelišta i ledišta i kalorijska svojstva (specifična toplina, toplinska vodljivost). Sva navedena svojstva bitno je procijeniti u odnosu na ispitivanu tvar s kojom otapalo dolazi u dodir. Nadalje, važni su i ekonomski faktori koji uključuju novčani trošak otapala te energetski i ekološki trošak za njegovu proizvodnju, recikliranje i smanjenje kontaminacije. Osim toga, mora postojati i kompatibilnost otapala s konačnom analitičkom opremom (Whim i Johnson, 2012).

#### 2.3.3.1. Konvencionalna otapala

Opsežna uporaba sintetskih organskih otapala prevladava u petrokemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i elektroničkoj industriji. Sintetska organska otapala pokazuju veliki kapacitet ekstrakcije prema hidrofilnim i hidrofobnim spojevima, ovisno o polarnosti korištenog otapala. Većina tih otapala su hlapljivi organski spojevi dobiveni iz neobnovljivih izvora (npr. fosilna goriva). Iako su vrlo učinkovita, sintetska organska otapala imaju brojne nedostatke, kao što su visoka toksičnost, visoka zapaljivost i bionerazgradivost (Ling i Hadinoto, 2022). Zbog ostataka otapala koji mogu ostati u konačnim proizvodima zahtijeva se dodatno pročišćavanje koje oduzima vrijeme i utječe na ukupne troškove procesa. Dodatno, korištenjem čistog organskog otapala, vrlo polarne fenolne kiseline (benzojeva, cimetna kiselina) ne mogu se potpuno ekstrahirati. U takvim slučajevima se predlažu mješavine alkohol-voda ili aceton-voda. Voskovi, ulja, steroli, klorofil izrazito su nepolarni spojevi i mogu se ekstrahirati iz materijala manje polarnim otapalima poput diklorometana, kloroforma, heksana i benzena. Prinos i brzina polifenolne ekstrakcije povezani su s karakteristikama otapala. Uočeno je da je metanol učinkovitiji u ekstrakciji polifenola niže molekularne težine dok je vodeni aceton prikladno otapalo za ekstrakciju polifenola veće molekulske mase (Brglez Mojzer i sur., 2016). Prevladavajuća uporaba sintetičkih organskih otapala u mnogim

industrijama i njihove naknadne neizbježne emisije u okoliš izazvale su zabrinutost zbog negativnih dugoročnih utjecaja tih otapala na okoliš. Stoga je pomak prema ekološki prihvatljivim otapalima (tj. manje toksičnim i biorazgradivim) bio u fokusu mnogih industrija s ciljem poboljšanja održivosti njihove proizvodnje (Ling i Hadinoto, 2022).

Otapala poput metanola, etanola, acetona, propanola, etil acetata i dimetilformamida su često korištena za ekstrakciju fenola iz svježih proizvoda u različitim koncentracijama vode (Luthria i Mukhopadhyay, 2006). Izolacija polifenola iz biljnih materijala ovisi o topljivosti fenolnih spojeva u otapalu korištenom za proces ekstrakcije, a polarnost otapala također igra ključnu ulogu u povećanju topljivosti fenola (Naczki i Shahidi, 2006).

Allothman i sur. (2009) su proveli ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz karakterističnog egzotičnog voća u Malaziji, banane, ananasa i guave. U istraživanju su određivali sadržaj polifenola i AOA te ispitivali učinkovitost različitih sustava otapala za ekstrakciju polifenola. Fenolni spojevi su ekstrahirani iz voća koristeći tri konvencionalna otapala: metanol, etanol i aceton u različitim omjerima s vodom. Rezultati su pokazali da su za ekstrakte ananasa aceton (50 %) i etanol (70 %) dali najveći prinos ukupnih fenola (TP), bez značajnih razlika među njima. Aceton (90 %) je dao najveći prinos TP ( $72,2 \pm 2,03$  mg GAE  $100\text{ g}^{-1}$ ) u ekstraktima banane, sa značajnom razlikom u usporedbi s ostalim korištenim sustavima otapala. Najveći prinos TP iz guave dobiven je korištenjem acetona (90 %) ili etanola (90 %), bez značajnih razlika među njima ( $p > 0,05$ ).

### 2.3.2. Duboka eutektička otapala (DES)

Subkritična voda, superkritične tekućine, ionske tekućine i DES-ovi nova su otapala, označena kao zelena otapala. Mala ili nikakva toksičnost za ljudsko zdravlje i okoliš, korištenje obnovljivih izvora, smanjenje opasnosti, manja potrošnja energije i održivost neka su od pogodnih svojstava navedenih otapala. Među zelenim otapalima, ionske tekućine i DES-ovi postali su sve popularniji primjeri zelenih otapala koja najviše obećavaju. Iako DES-ovi i ionske tekućine dijele slična fizička svojstva kao što su niska hlapljivost, visoka viskoznost, kemijska i toplinska stabilnost i nezapaljivost, DES-ovi se razlikuju od ionske tekućine, jer nisu u potpunosti sastavljeni od ionskih spojeva. Odnosno, DES-ovi se mogu pripremiti iz neionskih spojeva. Osim toga, u usporedbi s ionskom tekućinom, DES-ovi su općenito sigurniji, pokazuju bolju biorazgradivost i isplativiji su za pripremu budući da su napravljeni od prirodnih spojeva. Trenutno se DES-ovi koriste u širokom spektru aplikacija, uključujući elektrotaloženje, sintezu nanomaterijala, biotransformaciju, sintezu lijekova i sustava za isporuku lijekova te ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Ling i Hadinoto, 2022).

DES-ovi su jeftina otapala, biorazgradiva, netoksična i sigurna za okoliš, relativno jednostavna

za pripremu i skladištenje. To su smjese nabijenog akceptora vodika poput netoksičnih amonijevih soli (npr. kolin klorid) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, alkohola i karboksilnih kiselina, u određenom molarnom udjelu, gdje su navedene komponente povezane jakim vodikovim vezama. DES-ovi zbog delokalizacije naboja imaju svojstvo eutektičnosti tj. sniženo im je talište u odnosu na tališta zasebnih ishodnih tvari. Klasični primjer je smjesa kolin klorida (Ch) ( $T_t = 302\text{ °C}$ ) i uree ( $T_t = 133\text{ °C}$ ) u molarnom omjeru 1:2, a temperatura tališta navedenog otapala je  $15\text{ °C}$ . Fizikalna svojstva DES-a uključujući ledište, provodljivost, gustoću i viskoznost, ovise o vrsti DES-a odnosno o tvarima od kojih je napravljen. Kada su spojevi koji tvore DES-ove primarni metaboliti, aminokiseline, polialkoholi, organske kiseline, ugljikohidrati ili derivati kolina, takve smjese nazivaju se prirodnim eutektičkim smjesama (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). NADES-ovi imaju veću gustoću od vode dok viskoznost ovisi o udjelu vode u sintetiziranom DES-u i temperaturi. NADES-ovi u potpunosti ispunjavaju kriterije idealnog zelenog otapala, jer ih karakterizira niska cijena, dostupnost, jednostavna priprema, biorazgradivost, netoksičnost i mogućnost regeneracije, a zbog različitih kombinacija NADES-a, mogućnosti koje se javljaju za njihovu primjenu su mnogobrojne.

Chen i sur. (2021) koristili su DES (kolin klorid – glicerol) kao otapalo za ekstrakciju proteina iz soje i primijetili su da je ekstrakcija pomoću DES-a rezultirala približno 10 % većim prinosom ( $w\ w^{-1}$ ) u usporedbi s konvencionalnom metodom. Osim toga, proteini iz soje ekstrahirani pomoću DES-a pokazuju bolju otpornost na toplinu i jaču hidrofobnost od komercijalnih proteina iz soje, što ukazuje na to da DES može poboljšati funkcionalna svojstva proteina te da se ekstrahirani proteini mogu koristiti kao novi funkcionalni materijal.

Koutsoukos i sur. (2019) su otkrili da je prinos karotenoida iz pulpe marelice korištenjem DES-a (kolin klorid – vinska kiselina) kao otapala bio značajno veći i u ekstrakciji uz pomoć ultrazvuka (4 puta veći) i u ekstrakciji uz pomoć mikrovalova (3,5 puta veći), u usporedbi s ekstrakcijom gdje su korištena konvencionalna organska otapala.

DES koji je nastao iz smjese 1:2 kolin klorida i *p*-toluensulfonske kiseline, pokazao je potencijal kao otapalo s najvišom učinkovitošću ekstrakcije flavonoida iz plodova *Lycium barbarum* L., zbog svoje najveće polariziranosti i niže viskoznosti u usporedbi s drugim vrstama DES-ova i konvencionalnim otapalima primjenom UAE metode (Ali i sur., 2019).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

Uzorci korišteni u istraživanju su kora avokada, sorte Hass te kora banane, sorte Cavendish. Kore su zamrznute na – 80 °C nakon čega su liofilizirane, pakirane u vrećice te skladištene na suhom i tamnom mjestu. Neposredno prije provođenja analiza, uzorci su usitnjeni u električnom mlincu (GT11, Tefal, Rumily, Francuska).

##### 3.1.2. Pribor i oprema

- Menzura (10 i 50 mL)
- Laboratorijska čaša (250 i 500 mL)
- Ultrazvučna kupelj (ElmaSonic P, Elma Electronic GmbH, Pforzheim, Njemačka)
- Magnetna miješalica (IKA, Staufen, Njemačka)
- Filter papir
- Büchnerov lijevak
- Odmjerna tikvica (50 mL)
- Falcon kivete
- Vortex miješalica (IKA, Staufen, Njemačka)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, Wayne, PA, SAD)
- Zamrzivač (PLATILABTM 340 V 4-STD, Angelantoni Life Science, Massa Martana, Italija)
- Liofilizator (Alpha 1-4 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)

##### 3.1.1. Kemikalije i standardi

- etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- etanol 30 %-tni

priprema: S obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do

oznake.

- destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna vodena otopina  
priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjerne tikvici od 1000 mL i filtrira nakon 24 h.
- galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg mL<sup>-1</sup>  
priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM  
priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM  
priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol L<sup>-1</sup>. 500 mg troloxa se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.
- klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba, Milano, Italija)
- klorovodična kiselina, 40 mM  
priprema: otpipetira se 330 µL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), 10 mM  
priprema: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina  
priprema: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.
- glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba, Milano, Italija)
- natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6  
priprema: odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.
- FRAP reagens  
priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.
- 100 %-tni metanol
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)  
priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.
- 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$   
priprema: 0,1892 g  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  odvaži se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.
- 7 mM ABTS otopina  
priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- stabilna ABTS•+ otopina  
priprema: 88  $\mu\text{L}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  pri tome je 2,45 mmol  $\text{L}^{-1}$ .
- 1 %-tna otopina ABTS•+  
priprema: 1000  $\mu\text{L}$  ABTS•+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i



nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema DES otapala

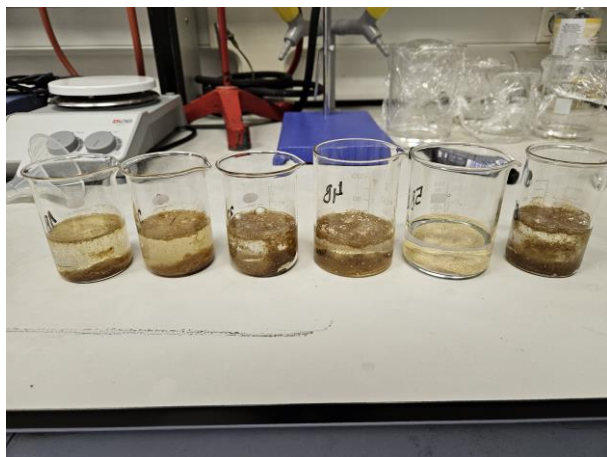
U čaši od 250 mL pomiješaju se odvagane mase tvari izračunate prema omjerima definiranim u eksperimentalnom dizajnu (tablica 5), u čašu se doda magnet i ona se postavi na magnetnu miješalicu na temperaturu 50 °C te se miješanje provodi dok se ne dobije homogena bistra tekućina. Takvo otapalo može se skladištiti nekoliko mjeseci u prikladnoj ambalaži.

**Tablica 5.** Eksperimentalni dizajn

KOMBINACIJA OTAPALA	MOLARNI OMJER	UDIO VODE U SMJESI (%)
kolin klorid + mliječna kiselina	1:3	10
		30
kolin klorid + glicerol	1:3	10
		30
kolin klorid + fruktoza	1,9:1	10
		30

#### 3.2.2. Postupak ekstrakcije

U laboratorijsku čašu od 150 mL se odvaže 1 g samljevenog uzorka kore banane/avokada te se menzurom doda 50 mL odgovarajućeg otapala (slika 4). Čaša se postavi u ultrazvučnu kupelj 20 min pri sobnoj temperaturi nakon čega se provodi filtracija uzoraka primjenom filter papira i lijevka (slika 5) u odmjernu tikvicu od 50 mL. Nakon filtracije, odmjerna tikvica se nadopuni do volumena te se uzorci prebace u plastične Falcon kivete u kojima se uzorci čuvaju do analize.



**Slika 4.** Usitnjeni uzorak banane pomiješan s 50 mL odgovarajućeg otapala (*vlastita fotografija*)



**Slika 5.** Filtracija uzorka avokada pomoću Büchnerov-og lijevka (*vlastita fotografija*)

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Za mjerenje apsorbancije uzoraka u svrhu određivanja AOA potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  uzorka i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. Apsorbancija se mjeri pri

593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje 80  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola. Iz dobivenih vrijednosti nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje AOA uzorka:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad (R^2 = 0,9995) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  kao srednja vrijednost tri paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Postupak određivanja provodi se prema metodi Shortle i sur. (2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se doda 2,25 ml 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Iz dobivenih vrijednosti nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 517 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje AOA uzorka:

$$Y = -0,008 X + 1,3476 \quad (R^2 = 0,9948) \quad [2]$$

gdje je:

Y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent troloxa (TAE) ( $\mu\text{M}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  kao srednja vrijednost tri paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

U epruvetu se stavi 160  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa i pomiješa s 2 mL 1 %-tnog ABTS•+ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni

pravac tako što se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 734 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje AOA uzorka:

$$Y = -0,002 X + 0,6204 \quad (R^2=0,998) \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 734 nm

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

$R^2$  – koeficijent determinacije

Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  kao srednja vrijednost tri paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.6. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Jednosmjerna analiza varijance korištena je za utvrđivanje signifikantnih razlika između uzoraka. Kao nezavisne varijable promatrani su različiti sustavi otapala, dok su vrijednosti AOA kore avokada i banane određene različitim metodama promatrane kao zavisne varijable. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti AOA kore avokada i banane ekstrahirane primjenom različitih DES-ova kao i konvencionalne 30 % otopine etanola te na taj način odrediti njihov utjecaj i učinkovitost u izolaciji antioksidanasa navedenih nusproizvoda. U svrhu dobivanja boljeg uvida u AOA ekstrakata, ona je određivana primjenom tri različite metode, DPPH, FRAP i ABTS. Rezultati navedenih istraživanja prikazani su u tablicama 6 i 7.

**Tablica 6.** Antioksidacijska aktivnost kore avokada mjerena DPPH, FRAP i ABTS metodom

Uzorak	N	Otapalo	Antioksidacijska aktivnost ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
			DPPH	FRAP	ABTS
Kora avokada	2	Kolin klorid + mliječna kiselina (1:3) + 10 % H <sub>2</sub> O	p<0,01† 286,42 ± 0,64 <sup>b</sup>	p<0,01† 278,28 ± 2,62 <sup>b</sup>	p<0,01† 353,20 ± 7,67 <sup>b</sup>
	2	Kolin klorid + mliječna kiselina (1:3) + 30 % H <sub>2</sub> O	344,90 ± 5,42 <sup>c</sup>	684,79 ± 18,68 <sup>e</sup>	513,66 ± 2,60 <sup>d</sup>
	2	Kolin klorid + glicerol (1:3) + 10 % H <sub>2</sub> O	300,24 ± 3,87 <sup>b</sup>	251,52 ± 0,00 <sup>b</sup>	388,46 ± 19,54 <sup>b</sup>
	2	Kolin klorid + glicerol (1:3) + 30 % H <sub>2</sub> O	390,58 ± 1,09 <sup>d</sup>	541,81 ± 17,51 <sup>d</sup>	538,35 ± 0,88 <sup>d,e</sup>
	2	Kolin klorid + fruktoza (1:1,9) + 10 % H <sub>2</sub> O	7,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,07 <sup>a</sup>
	2	Kolin klorid + fruktoza (1:1,9) + 30 % H <sub>2</sub> O	262,50 ± 8,52 <sup>b</sup>	418,87 ± 7,86 <sup>c</sup>	467,91 ± 10,22 <sup>c</sup>
	2	30 % vodena otopina etanola	378,84 ± 4,41 <sup>d</sup>	545,12 ± 5,43 <sup>d</sup>	563,18 ± 10,59 <sup>e</sup>

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. N=broj mjerenja. †statistički značajno pri  $p \leq 0,05$ . Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom statistički se razlikuju, pri čemu je najmanjoj vrijednosti dodijeljeno slovo a.

Iz priloženih rezultata određivanja AOA kore avokada (tablica 6) uočava se kako je ekstrakcijsko otapalo značajno utjecalo na dobivene vrijednosti AOA neovisno o primijenjenoj metodi za određivanje ( $p \leq 0,05$ ). Najviša vrijednost AOA određena je ABTS metodom u ekstraktu dobivenom primjenom kolin klorida i glicerola (1:3) s 30 % H<sub>2</sub>O ( $538,35 \pm 0,88 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). Isti ekstrakt imao je i najvišu AOA određenu DPPH metodom,  $390,58 \pm 1,09 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . Navedeni DES je prema rezultatima statističke analize pokazao podjednaku učinkovitost u izolaciji komponenata s AOA iz kore avokada kao i konvencionalno otapalo, 30 % etanol s kojim su ostvarene vrijednosti AOA  $378,84 \pm 4,41 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  DPPH metodom i  $563,18 \pm 10,59 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  ABTS metodom. FRAP metoda je pokazala nešto drukčije vrijednosti te je najviša AOA ostvarena primjenom kolin klorida i mliječne kiseline (1:3) s 30 % H<sub>2</sub>O kao ekstrakcijskog otapala ( $684,79 \pm 18,68 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). Kombinacija kolin klorida s glicerolom i 30 % H<sub>2</sub>O koja se pokazala najučinkovitijom u slučaju DPPH i ABTS metoda, je kod FRAP metode bila druga po učinkovitosti, dajući ekstrakt podjednake aktivnosti kao i 30 % etanol. Nadalje, može se uočiti kako su svi sustavi DES-ova korišteni u ovom radu bili učinkovitiji u izolaciji antioksidansa iz kore avokada s većim udjelom vode u svom sastavu, točnije s 30 % umjesto 10 % vode. Najniže AOA su kod sve tri metode određene u ekstraktu izoliranom s kolin kloridom i fruktozom (1:1,9) s 10 % H<sub>2</sub>O, rezultirajući vrijednostima od svega  $7,14 \pm 0,01$ ,  $2,23 \pm 0,03$  i  $4,20 \pm 0,07 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  određenim DPPH, FRAP i ABTS metodama.

Rodríguez-Carpena i sur. (2011) su svojim istraživanjem pokazali kako postoje značajne razlike u AOA kore avokada primjenom različitih otapala i sorti. Kao otapalo koristili su etil acetat, aceton i metanol i primijenili ABTS i DPPH metodu. Neovisno o korištenoj metodi najbolja svojstva pokazao je aceton sa vrijednostima  $103,75 \text{ mmol TE g}^{-1}$  i  $242,26 \text{ mmol TE g}^{-1}$  za ABTS metodu te  $88,94 \text{ mmol TE g}^{-1}$  i  $199,61 \text{ mmol TE g}^{-1}$  za DPPH metodu. Rezultati su dobiveni za Hass i Fuerte sortu. Ekstrakti dobiveni primjenom etil acetata pokazali su značajno manje vrijednosti od ostalih otapala ( $16,12$ ;  $34,82$  za ABTS metodu i  $17,85$ ;  $35,18$  za DPPH metodu iskazano u  $\text{mmol TE g}^{-1}$  za Hass i Fuerte sortu). U ovom istraživanju dobivene su značajno manje vrijednosti AOA od navedenih u istraživanju Rodríguez-Carpena i sur. (2011).

**Tablica 7.** Antioksidacijska aktivnost kore banane mjerena DPPH, FRAP i ABTS metodom

Uzorak	N	Otapalo	Antioksidacijska aktivnost ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
			DPPH	FRAP	ABTS
Kora banane	2	Kolin klorid + mliječna kiselina (1:3) + 10 % H <sub>2</sub> O	p<0,01† 131,05 ± 0,40 <sup>a</sup>	p<0,01† 469,31 ± 6,51 <sup>e</sup>	p<0,01† 89,27 ± 3,17 <sup>b</sup>
	2	Kolin klorid + mliječna kiselina (1:3) + 30 % H <sub>2</sub> O	123,90 ± 3,43 <sup>a</sup>	218,89 ± 8,94 <sup>d</sup>	105,23 ± 1,58 <sup>c</sup>
	2	Kolin klorid + glicerol (1:3) + 10 % H <sub>2</sub> O	210,10 ± 2,46 <sup>d</sup>	111,59 ± 7,97 <sup>b</sup>	132,90 ± 1,04 <sup>d</sup>
	2	Kolin klorid + glicerol (1:3) + 30 % H <sub>2</sub> O	107,49 ± 10,86 <sup>a</sup>	162,90 ± 7,68 <sup>c</sup>	95,58 ± 9,17 <sup>b,c</sup>
	2	Kolin klorid + fruktoza (1:1,9) + 10 % H <sub>2</sub> O	150,22 ± 2,49 <sup>b</sup>	9,31 ± 4,39 <sup>a</sup>	66,47 ± 4,28 <sup>a</sup>
	2	Kolin klorid + fruktoza (1:1,9) + 30 % H <sub>2</sub> O	173,94 ± 1,96 <sup>c</sup>	159,97 ± 13,69 <sup>c</sup>	91,70 ± 9,94 <sup>b,c</sup>
	2	30 % vodena otopina etanola	164,97 ± 1,85 <sup>b,c</sup>	39,02 ± 8,12 <sup>a</sup>	62,96 ± 1,05 <sup>a</sup>

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. N=broj mjerenja. †statistički značajno pri p≤0,05. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom statistički se razlikuju, pri čemu je najmanjoj vrijednosti dodijeljeno slovo a.

U tablici 7 prikazani su rezultati određivanja AOA kore banane primjenom različitih DES-ova i različitim metodama. Kao i kod avokada, možemo vidjeti da ekstrakcijsko otapalo značajno utječe na AOA dobivenih ekstrakata ( $p \leq 0,05$ ). Najviša vrijednost AOA određena je FRAP metodom u ekstraktu dobivenom primjenom kolin klorida i mliječne kiseline (1:3) s 10 % H<sub>2</sub>O i iznosi  $469,31 \pm 6,51 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  te se značajno razlikuje od vrijednosti drugih ekstrakata. Ekstraktu dobivenom primjenom kolin klorida i glicerola (1:3) s 10 % H<sub>2</sub>O određene su najveće vrijednosti AOA DPPH i ABTS metodom ( $210,10 \pm 2,46 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ;  $132,90 \pm 1,04 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). Navedeni DES-ovi su prema rezultatima statističke analize pokazala značajno veću učinkovitost u izolaciji komponenata s AOA iz kore banane nego konvencionalno otapalo, 30 % vodena otopina etanola. Nadalje, može se uočiti da su kod ekstrakcije kore banane veću učinkovitost pokazali sustavi DES-ova s manjim udjelom vode, točnije 10 %. Prema rezultatima DPPH metode, najniže AOA određene su u ekstraktima dobivenim primjenom kolin klorida i mliječne kiseline (1:3) s 10 i 30 % H<sub>2</sub>O te primjenom kolin klorida i glicerola (1:3) s 30 % H<sub>2</sub>O. Ekstrakti dobiveni primjenom kolin klorida i fruktoze (1:1,9) s 10 % H<sub>2</sub>O i 30 % vodenom otopinom etanola su pokazali najmanju AOA prema FRAP i ABTS metodama.

Bratovcic i sur. (2020) su za koru banane FRAP i ABTS metodom dobili vrijednosti  $6,98 \text{ mmol Fe}^{2+} 100 \text{ g}^{-1}$  s.tv. i  $1,36 \text{ mg TE } 100 \text{ g}^{-1}$  s.tv., dok su Vu i sur. (2016) proveli istraživanje DPPH, ABTS i FRAP metodom čime su dobili sljedeće vrijednosti  $47,09$ ;  $48,38$  i  $42,26 \text{ mg TE g}^{-1}$  s.tv.

Iz priloženih tablica 6 i 7 može se vidjeti kako kora avokada ima veću AOA od kore banane neovisno o korištenoj metodi. FRAP metodom određene su najviše vrijednosti kod oba uzorka, zatim slijede ABTS i DPPH kod kore avokada, a kod kore banane DPPH i ABTS. Kod oba uzorka se može vidjeti značajno bolja učinkovitost otapala kolin klorida i mliječne kiseline te kolin klorida i glicerola od kombinacije kolin klorida i fruktoze. Zanimljivo je da su pri izolaciji antioksidanasa iz kore avokada bili učinkovitiji DES-ovi s višim udjelom vode, dok su kod kore banane to bila otapala s 10 % vode u sastavu. Nadalje, značajnu razliku između uzoraka možemo uočiti pri usporedbi s 30 % vodenom otopinom etanola koja je kod kore avokada pokazala gotovo najviše rezultate AOA, dok kod kore banane ona predstavlja najniže određene vrijednosti AOA.

Zannou i sur. (2021) su u istraživanju uspoređivali otapalo kolin klorida i glicerola sa konvencionalnim otapalima, metanolom, etanolom i vodom, u ekstrakciji antocijana iz *Echium amoenum*. Koristili su DPPH i FRAP metodu te neovisno o metodi dobili bolje rezultate AOA za kolin klorid i glicerol nego za konvencionalna otapala.

Ivanović i sur. (2022) su također u svom istraživanju uspoređivali učinkovitost DES-ova i konvencionalnih otapala, etanola, metanola i vode u ekstrakciji bioaktivnih metabolita iz *Achillea millefolium* L. DES-ovi su općenito pokazali značajno veće rezultate od



konvencionalnih otapala. Međutim, može se uočiti razlika u rezultatima za otapala kolin klorida i mliječne kiseline u ovisnosti o metodi određivanja AOA. U FRAP metodi vrijednost je bila 58,52 mg TE g<sup>-1</sup> s.tv. koja je značajno veća od vrijednosti za etanol, metanol i vodu (22,44; 22,50; 18,84 mg TE g<sup>-1</sup> s.tv.), a u ABTS metodi 41,48 mg Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> s.tv. što je gotovo isto iznosima za etanol, metanol i vodu (40,95; 40,51; 42,75 mg Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> s.tv.).

Ling i sur. (2020) su proveli ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz *Mangifera pajang* koristeći konvencionalno otapalo etanol i DES-ove te su uspoređivali učinkovitost DES-ova s različitim udjelima vode. Otapalo kolin klorid i glicerol (1:2) ispitivan je sa 10 – 50 % vode. Rezultati su pokazali da je dodatak 20 % vode pokazao najbolja ekstrakcijska svojstva te je izmjerena AOA iznosila 11,48 ± 0,09 mg ekvivalenata askorbata antioksidacijskog kapaciteta g<sup>-1</sup> (mg AEAC g<sup>-1</sup>). Također je zapaženo da se prilikom povećanja udjela vode s 10 na 20 % AOA povećala za 4,18 %. Iz navedenih rezultata može se uočiti kako dodatak vode pozitivno utječe na ekstrakciju, odnosno AOA, što je u skladu s našim opažanjima u slučaju kore avokada.

Chen i sur. (2021) su razmatrali antioksidacijsko djelovanje ekstrakata s etanolom i DES-om iz ploda *Rubia truppeliana* i ploda *Rubia cordifolia*. Iz rezultata se može vidjeti da ekstrakti tretirani DES-om imaju veća AOA od onih tretiranih s etanolom. Najviši rezultati AOA, dobiveni primjenom DES-a su 60,8 i 68,3 % u DPPH metodi, 68,8 i 75 % u ABTS metodi, te 59,5 i 62,2 mmol TE g<sup>-1</sup> u FRAP metodi, temeljeni na uzorku od 1,0 mg mL<sup>-1</sup>.

Barbieri i sur. (2020) su koristili DES-ove za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz ružmarina te usporedili s etanolom. Rezultati određivanja AOA FRAP metodom pokazali su značajnu razliku između etanola i DES-ova. Etanol je imao najmanju vrijednost AOA (49,14 mM TE g<sup>-1</sup>), a DES-ovi značajno višu (126,23-183,82 mM TE g<sup>-1</sup>). DPPH metoda nije pokazala tolike razlike te su vrijednosti AOA etanolnog ekstrakta (132,19 mg GAE g<sup>-1</sup>) bile približno iste vrijednostima za DES-ove (132,53-155,83 mg GAE g<sup>-1</sup>).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Kora avokada i banane pokazala se kao značajan izvor komponenata s AOA.
2. AOA kore avokada određena je u ovisnosti o ekstrakcijskom otapalu u rasponu od 7,14 - 390,58  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DPPH metodom, 2,23 - 684,79  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  FRAP metodom i 4,2 - 563,18  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  ABTS metodom.
3. Kolin klorid i mliječna kiselina (1:3) s 30 %  $\text{H}_2\text{O}$  i kolin klorid i glicerol (1:3) s 30 %  $\text{H}_2\text{O}$  pokazali su se kao najučinkovitiji DES-ovi u ekstrakciji komponenata kore avokada neovisno o korištenoj metodi određivanja AOA.
4. DES-ovi su se pri ekstrakciji bioaktivnih spojeva kore avokada pokazali podjednako učinkoviti kao i 30 % vodena otopina etanola.
5. AOA kore banane određena je u ovisnosti o ekstrakcijskom otapalu u rasponu od 107,49 - 210,10  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DPPH metodom, 9,31 - 469,31  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  FRAP metodom i 62,96 - 132,90  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  ABTS metodom.
6. Kolin klorid i mliječna kiselina (1:3) s 10 %  $\text{H}_2\text{O}$  i kolin klorid i glicerol (1:3) s 10 %  $\text{H}_2\text{O}$  su se pokazali kao najučinkovitiji DES-ovi za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kore banane.
7. U slučaju kore banane DES-ovi su se pokazali znatno efikasniji od 30 % vodene otopine etanola.

## 6. POPIS LITERATURE

Akinyele BJ, Agbro O (2007) Increasing the Nutritional Value of Plantain Wastes by the Activities of Fungi Using the Solid State Fermentation Technique. *Res. J. Microbiol.* **2**, 117-124. <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2007.117.124>

Aladić K (2015) Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkričnim CO<sub>2</sub> iz pogače nakon hladnog prešanja (doktorska disertacija). Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Ali MC, Chen J, Zhang H, Li Z, Zhao L, Qiu H (2019) Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta* **203**, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>.

Alothman M, Bhat R, Karim AA (2009) Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Selected Tropical Fruits from Malaysia, Extracted with Different Solvents. *Food Chem.* **115**, 785-788. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>

Anonymous 1 (2023) Epic Gardening. Pristupljeno: 13. srpnja 2024. <https://www.epicgardening.com/tennessee-avocado-trees/>

Anonymous 2 (2024) Britannica. Pristupljeno: 13. srpnja 2024. <https://www.britannica.com/plant/banana-plant>

Ayala-Zavala JF, Vega-Vega V, Rosas-Domínguez C, Palafox-Carlos H, Villa-Rodríguez JA, Wasim Siddiqui MD i sur. (2011) Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Int. Food Res.* **44**, 1866-1874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>

Araujo RG, Rodriguez-Jasso RM, Ruiz HA, Pintado MME, Aguilar CN (2018) Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* **80**, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>

Barbieri JB, Goltz C, Cavaleiro FB, Toci AT, Igarashi-Mafra L, Mafra MR (2020) Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. *Ind. Crops Prod.* **144**, 112049.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112049>.

Bashmil YM, Ali A, BK A, Dunshea FR, Suleria HAR (2021) Screening and Characterization of Phenolic Compounds from Australian Grown Bananas and Their Antioxidant Capacity. *Antioxidants* **10**, 1521. <https://doi.org/10.3390/antiox10101521>

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Braca A, Tommasi ND, Bari LD, Pizza C, Politi M, Moreli I (2001) Antioxidant Principles from *Bauhinia Terapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895. <http://dx.doi.org/10.1021/np0100845>

Bratovcic A, Djapo-Lavic M, Kazacic M, Mehic E (2021) Evaluation of antioxidant capacities of orange, lemon, apple and banana peel extracts by FRAP and ABTS methods. *Rev. Roum. Chim.* **66**, 713–717. <https://doi.org/10.33224/rrch.2021.66.8-9.03>

Bressani R, Rodas B, Ruiz AS (2009) The chemical composition, antioxidant capacity and nutritional value of the seed of avocado varieties. Tegucigalpa (Guatemala): National Science and Technology Fund-F ONACYT, University of the Valley of Guatemala-UVG.

Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**, 901.

<https://doi.org/10.3390/molecules21070901>

Chen Q, Chaihu L, Yao X, Cao X, Bi W, Lin J i sur. (2021) Molecular property-tailored soy protein extraction process using a deep eutectic solvent. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **9**, 10083–10092. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01848>

Daiuto ER, Tremocoldi MA, Alencar SM i Vieites RL (2014.) Chemical composition and antioxidant activity of the pulp, peel and by products of avocado 'Hass. *Rev. Bras. Frutic.* **36**, 417-424. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-102/13>

Fabricant DS, Farnsworth NR (2001) The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* **109**, 69-75.

<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.01109s169>

FAO (2024) Major Tropical Fruits Market Review – Preliminary Results 2023. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/markets-and-trade/publications/en/?category=104999> . Pristupljeno 1. srpnja 2024.

Feldman JM, Lee EM (1985) Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 639-643.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/42.4.639>

García-Vargas MC, Contreras MdM, Gómez-Cruz I, Romero-García JM, Castro E (2020) Avocado-Derived Biomass: Chemical Composition and Antioxidant Potential.

*Proceedings* **70**, 100. [https://doi.org/10.3390/foods\\_2020-07750](https://doi.org/10.3390/foods_2020-07750)

Gorinstein S, Poovarodom S, Kruszewska H, Leontowicz M, Namiesnik J, Vearasilp S i sur. (2011) Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits: In vitro and in vivo studies. *Int. Food Res.* **44**, 2222-2232.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.009>

Ivanović M, Grujić D, Cerar J, Islamčević Razboršek M, Topalić-Trivunović L, Savić A i sur. (2022) Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants* **11**, 724.

<https://doi.org/10.3390/antiox11040724>

Jideani AIO, Anyasi TA (2020) Banana Nutrition - Function and Processing Kinetics, 1. izd., IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76736>

Ling JKU, Hadinoto K (2022) Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3381.

<https://doi.org/10.3390/ijms23063381>

Ling JKU, Chan YS, Nandong J (2020) Extraction of antioxidant compounds from the wastes of *Mangifera pajang* fruit: a comparative study using aqueous ethanol and deep eutectic solvent. *SN Appl. Sci.* **2**, 1365. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3153-x>

Luthria DL, Mukhopadhyay S (2006) Influence of Sample Preparation on Assay of Phenolic Acids from Eggplant. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 41-47. <https://doi.org/10.1021/jf0522457>

Lyu X, Agar OT, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HAR (2023) Phenolic Compounds Profiling and Their Antioxidant Capacity in the Peel, Pulp, and Seed of Australian Grown Avocado. *Antioxidants* **12**, 185. <https://doi.org/10.3390/antiox12010185>

Maduwanthi SDT, Marapana RAUJ (2020) Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of banana (*Musa acuminata*, AAB) as affected by induced ripening agents. *Food Chem.* **1**, 339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127909>.

Naczka M, Shahidi F (2006) Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523-1542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>

Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* **133**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>

Permal R, Leong Chang W, Seale B, Hamid N, Kam R. (2020) Converting industrial organic waste from the cold-pressed avocado oil production line into a potential food preservative. *Food Chem.* **306**, 125635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125635>

Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M (2011) Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5625–5635. <https://doi.org/10.1021/jf1048832>

Sasidharan R, Hartman S, Liu Z, Martopawiro S, Sajeev N, Veen HV i sur. (2018) Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiol.* **176**, 1106–1117. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01232>

Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA (1993) Avocado. U: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA Biochemistry of Fruit Ripening. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1584-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1584-1_2)

Sáyago-Ayerdi SG, Venema K, Taberner M, Sarriá B, Bravo L, Mateos R (2021) Bioconversion of polyphenols and organic acids by gut microbiota of predigested *Hibiscus sabdariffa* L. calyces and Agave (*A. tequilana* Weber) fructans assessed in a dynamic in vitro model (TIM-2) of the human colon. *Int. Food Res.* **143**, 110301. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110301>.

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Koutsoukos S, Tsiaka T, Tzani A, Zoumpoulakis P, Detsi A (2019) Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *J. Clean. Prod.* **241**, 118384. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>.

Tlais AZA, Fiorino GM, Polo A, Filannino P, Di Cagno R (2020) High-Value Compounds in Fruit, Vegetable and Cereal Byproducts: An Overview of Potential Sustainable Reuse and Exploitation. *Molecules* **25**, 2987. <https://doi.org/10.3390/molecules25132987>

Tsado AN, Okoli NR, Jiya AG, Gana D, Saidu B, Zubairu R i sur. (2021) Proximate, Minerals, and Amino Acid Compositions of Banana and Plantain Peels. *Biomed. Nat. Appl. Sci.* **1**, 32-

42. <https://doi.org/10.53858/bnas01013242>

Vankar PS (2004) Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance* **9**, 30-41. <https://doi.org/10.1007/BF02834854>

Vinha AF, Moreira J, Barreira SVP (2013) Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea americana* Mill.). *J. Agric. Sci.* **5**, 100-109. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n12p100>.

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *J. Funct. Foods* **40**, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *J. Food Process. Preserv.* 1-14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13148>

Wang L, Weller CL (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

Whim BP, Johnson PG (2012) Directory of Solvents, 1. izd., Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1549-7>

Zannou O, Pashazadeh H, Ghellam M, Ibrahim SA, Koca I (2021) Extraction of Anthocyanins from Borage (*Echium amoenum*) Flowers Using Choline Chloride and a Glycerol-Based, Deep Eutectic Solvent: Optimization, Antioxidant Activity, and In Vitro Bioavailability. *Molecules* **27**, 134. <https://doi.org/10.3390/molecules27010134>



## Izjava o izvornosti

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

*Otilija Štargl*

---

Vlastoručni potpis