

Utjecaj ultrazvuka u ekstrakcijama iz suhe kore rajčice, te antioksidativnu aktivnost ekstrakata

Klemen, Filip

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:159:345968>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Filip Klemen

0058218997

**Utjecaj ultrazvuka u ekstrakcijama iz suhe kore rajčice, te
antioksidativnu aktivnost ekstrakata**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:

PRIMA H2020 GA2032, FunTomP – Functionalized Tomato Products

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2024

Ovaj rad financiran je sredstvima projekta PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>). FunTomP je multidisciplinarni projekt koji uključuje 16 zemalja, a koji ima za cilj preformulirati tradicionalne mediteranske proizvode od rajčice, u različite funkcionalne namirnice koristeći proteine lista (nusproizvodi prerade šećerne repe) i maslina u prahu. U projektu se koriste i nove, te ekološki prihvatljive tehnologije prerade koje će minimalno utjecati na hranjive tvari, s dodatnim zdravstvenim prednostima uz održavanje održivog ciklusa proizvoda i procesa te valoriziranjem poljoprivrednog otpada.

This work was financed by the ongoing project PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>), a multidisciplinary project involving 16 countries, that aims to reformulate traditional Mediterranean tomato products into different functional foods using leaf proteins (by-products of sugar beet processing) and olive powder and novel and eco-friendly processing technologies that will minimally affect nutrients, with extra health benefits while keeping a sustainable product and process cycle and by valorising agricultural waste.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj ultrazvuka u ekstrakcijama iz suhe kore rajčice, te antioksidativnu aktivnost ekstrakata

Filip Klemen, 0058218997

Sažetak:

Primjenom ultrazvuka visokog intenziteta (UAE) i toplinskog tretmana, iz osušene kore rajčice ekstrahirani su spojevi koji pokazuju antioksidativnu aktivnost. Kao ekstrakcijsko otapalo korišteni su deionizirana voda te 25 i 50 %-tna otopina etanola. Antioksidacijska aktivnost (AA) određena je FRAP i DPPH metodama. S ciljem optimizacije procesa ekstrakcije ispitani su utjecaji amplitude (50, 75 i 100 %), vremena tretiranja (3,6 i 9 min) te primjena ekstrakcijskog otapala na AA ekstrakata. Također se i pratila promjena u AA uzorka nakon sedmodnevnog skladištenja na temperaturi od +4 °C. Statističkom analizom rezultata (STATGRAPHICS Centurion) nakon provedenih toplinskih i ultrazvučnih ekstrakcija utvrđen je statistički značajan utjecaj kvadratne interakcije udjela etanola ($p < 0,05$) na izlaznu vrijednost AA određene FRAP i DPPH metodama. Najveći pad (79,47 %) AA nakon skladištenja utvrđen je kod uzorka TU 10 (amplituda: 50 %, vrijeme tretiranja: 3 minute, ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola) koji je podvrgnut ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom. Najveća vrijednost AA $34,5 \pm 0,42 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{suhe tvari (s.tv.)}}$ prije skladištenja određena FRAP metodom dobivena je kod uzorka T25/9 (vrijeme tretiranja: 9 minuta, ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola) tretiranog toplinskom metodom, dok je najveća AA vrijednost ($9,8 \pm 0,24 \mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) izmjerena DPPH metodom dobivena kod uzorka T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minute, ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda). Najmanja AA vrijednost ($0,38 \pm 0 \mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) prije skladištenja uočena je kod uzorka TU15 (amplituda: 50 %, vrijeme tretiranja: 3 minute, ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola) koji je podvrgnut UAE.

Ključne riječi: suha kora rajčice, ekstrakcija, ultrazvuk, antioksidativna aktivnost

Rad sadrži: 53 stranice, 13 slika, 12 tablica

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Josipa Dukić, mag. ing.

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD
Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology
Department of General Programmes
Laboratory for Sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

The influence of ultrasound in extractions from dried tomato peel, and antioxidant activity of extracts

Filip Klemen, 0058218997

Abstract:

High power ultrasound (UAE) and thermal treatment were used to assist and accelerate in extraction from dried tomato peels. Compounds possessing antioxidant capacity were efficiently extracted. Deionized water, 25 % ethanol, and 50 % ethanol were used as extraction solvents. The antioxidant activity (AA) was determined using the FRAP and DPPH methods. To optimize the extraction process, the effects of amplitude (25 %, 75 %, and 100 %), treatment time (3, 6, and 9 minutes), and extraction solvent (deionized water, 25 % ethanol, and 50 % ethanol) on AA were investigated. In addition, the changes in the AA of the samples after 7 days of storage were also observed. Statistical analysis of the obtained results was performed by using the STATGRAPHICS Centurion software and statistically significant effect of the quadratic interaction of ethanol content ($p < 0,05$) on the AA (determined by the FRAP and DPPH methods) was observed. Before storage, the highest AA ($34,5 \pm 0,42 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g dry matter}$) determined by the FRAP method, was obtained in thermally-treated sample T25/9 (9 min, 25% ethanol solution as extraction solvent), while the highest AA value ($9,8 \pm 0,24 \mu\text{mol Trolox}/\text{g dry matter}$) determined by the DPPH method was obtained in thermally-treated sample T0/3 (3 min, deionized water as extraction solvent). The lowest AA ($0,38 \pm 0 \mu\text{mol Trolox}/\text{g dry matter}$) was obtained in the ultrasonically treated sample TU 15 (amplitude 50%, 3 min, 25% ethanol solution as extraction solvent). The greatest decrease (60.94%) in AA after storage time was observed in the ultrasonically treated sample TU 24 (100% amplitude, 9 min treatment time, 50% ethanol as extraction solvent).

Keywords: dried tomato peel, extraction, ultrasound, antioxidant activity

Thesis contains: 53 pages, 13 figures, 12 tables

Original language: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Josipa Dukić, MSc

Thesis defended:

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Rajčica	2
2.2 Ekstrakcija	5
2.3 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta	6
2.4 Antioksidansi i metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1 Materijali	13
3.1.1 Kora rajčice	13
3.1.2 Kemikalije	13
3.1.3 Uređaji	14
3.1.4 Laboratorijsko posuđe	14
3.2 Metode	15
3.2.1 Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase (105 °C)	15
3.2.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta	16
3.2.3 Toplinska ekstrakcija	18
3.2.4 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	19
3.2.5 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1 Rezultati mjerenja	21
5. ZAKLJUČCI	36
6. POPIS LITERATURE	37
7. POPIS SLIKA	41
8. PRILOZI	43

1. UVOD

U današnje vrijeme, održivost i potraga za novim izvorima hrane postali su ključni prioriteti za čovječanstvo. U tom kontekstu, iskorištavanje otpada i nusproizvoda iz prehrambene industrije nudi značajan potencijal za unapređenje održivih prehrambenih sustava. Trenutno, ostaci hrane i otpad nastali tijekom proizvodnje hrane predstavljaju veliki izazov. Ti ostatci ne samo da uzrokuju ekonomske gubitke u svim dijelovima lanca prehrambene proizvodnje, već i postaju sve važniji problem u pogledu smanjenja zagađenja, povećanja prihoda industrije i poboljšanja recikliranja.

Većina otpada od hrane trenutno se koristi za proizvodnju biogoriva, vlakana i stočne hrane. Međutim, sve je više dokaza da bi se otpad od hrane mogao učinkovitije iskoristiti kao izvor bioaktivnih spojeva veće vrijednosti i značaja za ljudsku prehranu, uključujući fenole, pigmente, vitamine, peptide i aromatske spojeve (Fernando i sur., 2021).

Kod prehrambene industrije, sjemenke i kora rajčice čine otprilike 1-4 % ukupne mase rajčica korištenih u proizvodnji. Nakon tehnološkog procesa, ovi dijelovi često završavaju kao hrana za životinje ili se odlažu na odlagališta otpada. Ipak, kora rajčice sadrži velike količine vrijednih spojeva, poput karotenoida, pri čemu je likopen glavni sastojak (80–90 % ukupnih karotenoida), dok β -karoten čini oko 2–3 % (Dumas i sur., 2003).

Navedene bioaktivne komponente mogu se izdvojiti iz kore rajčice raznim postupcima ekstrakcije. Iako se ekstrakcije često provode konvencionalnim metodama poput zagrijavanja u vodenoj kupelji, sve se više koriste alternativne, netoplinske metode, poput ultrazvuka visokog intenziteta (Chavan i sur., 2022).

Cilj ovog završnog rada je odrediti utjecaj ultrazvuka u ekstrakcijama iz suhe kore rajčice, usporediti utjecaj ultrazvučnih i toplinskih tretmana na ekstrakcije iz suhe kore rajčice, te odrediti antioksidativnu aktivnost dobivenih ekstrakata. Konkretno, istražiti će se i optimirati utjecaj parametara amplitude (50 %, 75 % i 100 %), vremena tretiranja (3, 6 i 9 minuta), ekstrakcijskog otapala (deionizirana voda, 25 %-tna otopina etanola i 50 %-tna otopina etanol) te vremena skladištenja na antioksidativnu aktivnost prethodno spomenutih uzoraka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Rajčica

Rajčica (*Solanum lycopersicum* L.) je zeljasta trajnica koja pripada porodici pomoćnica. Karakterizira je uspravna i izrazito razgranata stabljika, s naizmjenično raspoređenim listovima (Lešić i sur., 2004). Listovi rajčice dugački su do 40 cm i imaju dvostruku raspoređenu strukturu. Cvjetovi su dvospolni i pravilni te se nalaze na dugim stapkama u pazušcima listova, grupirani u cvatove. Cvijet se sastoji od čaške i vjenčića. Čašku čini pet zelenih latica, dok je vjenčić sačinjen od pet žutih latica. Tučak ima izraženu plodnicu s mnogo sjemenih zametaka, s kratkim vratom i okruglastom njuškom, a prašnika ima 5-6. Plod je sočan, glatke i sjajne površine, mesnate strukture, crvene, narančaste i crne boje. Sjemenke rajčice su spljoštene i duge 2-4 mm.

Crvene rajčice su daleko najpoznatija vrsta rajčica. Kada sazru, plodovi crvenih rajčica postaju krupni i jarko crvene boje. Crvene rajčice tijekom sazrijevanja potpuno razgrađuju klorofil, dok se istovremeno povećava biosinteza likopena, što rezultira izrazito crvenim plodovima. Ovaj proces omogućava razvoj bogate crvene boje karakteristične za zrele crvene rajčice. Zbog svojeg uravnoteženog slatko-kiselkastog okusa i sočne teksture, crvene rajčice su široko rasprostranjene i često se koriste u različitim kulinarskim receptima. Udio likopena u rajčicama ovisi i o tome gdje se rajčica uzgaja. Rajčice uzgajane u stakleniku imaju manji udio likopena, dok rajčice u poljima imaju veći udio (Khan i sur., 2021). Kemijski sastav te sadržaj minerala u koži rajčice prikazan je u Tablici 1. Osim toga koncentracija spojeva kao što su ukupni flavonoidi, likopen te askorbinska kiselina varira ovisno o kultivaru (Excell, Tradiro i Flavourine) i dijelu ploda (koža/pulpa/sjemenke) iz kojeg su ekstrahirani (Tablica 2).

Tablica 1. Kemijski sastav te sadržaj minerala u koži rajčice (prema Elbadrawy i Sello, 2011)

Kemijski sastav (g/100g)		Mineralne komponente (mg/100g)	
Proteini	10,5	Ca	160
Masti	4,04	Mg	149
Pepeo	5,90	Fe	1,5
Ugljikohidrati	78,56	Cu	1,1
Masne kiseline (%)		Cr	0,06
Miritinska kiselina	0,34	Co	0,01
Palmitinska kiselina	15,19	Ni	0,66
Stearinska kiselina	6,84	Zn	3,12
Suma zasićenih kiselina	22,37	Mn	1,4
Palmitooleinska kiselina	1,82	Na	73,6
Oleinska kiselina	19,14	Se	0,01
Linolna kiselina	52,41	Pb	0,05
Linolenska kiselina	4,26	Cd	0,02
Suma nezasićenih kiselina	77,63	K	1097

Za razliku od crvenih rajčica, plodovi crne rajčice okruglog su oblika i crvenkasto-crne boje (Park i sur., 2018). Crne rajčice imaju distinktivnu crvenkastu crnu kožu s većim sadržajem likopena (185 mg/kg) u usporedbi s tipičnim crvenim rajčicama (Martínez-Valverde i sur., 2002; Raffo i sur., 2006; Seo i sur., 2013). Za razliku od tipičnih crvenih rajčica, crne rajčice zadržavaju klorofil zajedno s sintezom likopena i razvijaju uočljivu crvenkasto-crnu kožu (Ekelund i Jönsson, 2011). Tijekom sazrijevanja „Kumoto“ crnih rajčica, smanjena razgradnja klorofila može se preciznije opisati kao rezultat maskiranja gena LeSGR1, što inhibira njegovo djelovanje u degradaciji klorofila, slično mehanizmu koji uzrokuje fenotip mutiranog kultivara rajčice sa zelenim mekim dijelom (Hu i sur., 2011).

Rajčice su izvrstan izvor raznih nutrijenata i sekundarnih biljnih metabolita poput flavonoida, vitamina, minerala, organskih kiselina te sadrže esencijalne aminokiseline (Elbadrawy i Sello, 2011). Upotreba rajčica u prehrani sve se više povezuje s prevencijom mnogih bolesti i unaprjeđenjem zdravlja zahvaljujući visokom sadržaju antioksidanasa poput tokoferola, askorbinske kiseline, fenola te karotenoida poput likopena i β -karotena (Martínez-Valverde i sur., 2002; Periago i sur., 2009). Tokoferoli i askorbinska kiselina osjetljivi su na visoke temperature, no polifenoli i likopen iz kore rajčice nisu (Navarro-González i sur., 2011).

U Tablici 2. prikazane su prosječne količine nekih komponenti s antioksidativnim djelovanjem u različitim dijelovima biljke (koža, sjemenke i pulpa) za tri sorte rajčice (Excell, Tradiro i Flavourine) uzgojene u komercijalnom stakleniku. Količina antioksidansa u svakoj frakciji za svaku sortu izračunata je na temelju njihove stvarne svježje mase u cijeloj rajčici (Toor i sur., 2005).

Tablica 2. Glavni antioksidansi u koži, pulpi i sjemenu tri različita kultivara rajčice (prema Toor i sur., 2005)

Dio rajčice	Ukupni fenoli (mg GAE/100g)		Ukupni flavonoidi (mg rutin eq/100g)	Likopen (mg/100g)	Askorbinska kiselina (mg/100 g)
	Hidrofilni ekstrakt	Lipofilni ekstrakt			
Koža	29,1±1,12 ^a	5,6±0,21 ^a	20,4±0,61 ^a	8,7±1,12 ^a	16,9±0,89 ^a
Pulpa	12,7±2,03 ^c	2,3±0,12 ^c	8,2±0,37 ^c	2,8±0,14 ^b	8,9±0,59 ^b
Sjemenke	22,00±3,76 ^b	3,5±0,33 ^b	12,1±1,18 ^b	1,6±0,10 ^c	8,4±0,78 ^b

* rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednjih vrijednosti triju kultivara (Excell, Tradiro i Flavourine)

** različita slova pored broječnih vrijednosti predstavljaju statistički značajnu razliku na razini vjerojatnosti od 0,05 ($p < 0,05$)

2.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja ili separacije supstanci iz materijala ili smjese pomoću odgovarajućih otapala ili metoda. Ovaj proces se često koristi u kemijskim, farmaceutskim, prehrambenim i biotehnološkim industrijama za dobivanje određenih tvari ili spojeva iz sirovina. Za to se izdvajanje klasičnim postupcima rabe pretežno organska otapala: metanol, etanol, eter, kloroform, diklormetan, benzen i dr. (Stanić i Senjković, 1994).

Postoji podjela na toplinske (konvencionalne) i netoplinke tehnike ekstrakcije, pri čemu se toplinske tehnike oslanjaju na primjenu topline tijekom procesa, dok netoplinke tehnike ne uključuju primjenu visokih temperatura prilikom tretiranja. Toplinske tehnike uključuju ekstrakciju otapalom, destilaciju, sublimaciju i uparivanje, dok netoplinke tehnike obuhvaćaju ekstrakciju otapalom pri sobnoj temperaturi, hladnu ekstrakciju, ultrazvučnu ekstrakciju, ekstrakciju super kritičnim fluidom, ekstrakciju visokim tlakom, ekstrakciju potpomognutu enzimima i dr. Odabir odgovarajuće tehnike ekstrakcije ovisi o svojstvima sirovina, ciljanim tvarima i konačnoj svrsi ekstrakcije (Bitwell i sur., 2023).

Moderni napredni postupci, poput ultrazvučne ekstrakcije visokog intenziteta, koriste se za poboljšanje učinkovitosti procesa. Kavitacija uzrokovana ultrazvukom omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal, što rezultira većim izljevom ekstrahiranih supstanci i povećanim prijenosom mase. Ovi moderni pristupi imaju potencijal da unaprijede ekstrakcijske procese smanjenjem potrebe za tradicionalnim otapalima i povećanjem izlazne učinkovitosti. Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Također, zahvaljujući rastućim interesom javnosti za sigurnijim i ekološki prihvatljivim spojevima, razvoj zelene tehnologije značajno je unaprijedio dobivanje prirodnih spojeva za prehrambenu industriju kroz inovativne ekstrakcijske tehnike poput ekstrakcije superkritičnim fluidom, ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ekstrakcije pod visokim tlakom. Ova tehnološka inovacija omogućuje ekološki prihvatljiviju proizvodnju, smanjujući stvaranje toksičnih nusprodukata, no suočava se s izazovom visokih početnih i operativnih troškova (Picot-Allain i sur., 2021).

2.3 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta

Ultrazvuk predstavlja zvuk s frekvencijom iznad gornje granice čujnosti ljudskog uha. Uobičajena područja frekvencije za primjenu ultrazvuka su između 20 kHz i 10 MHz, dok se pri ispitivanju materijala najčešće koriste frekvencije između 50 kHz i 10 MHz (Astráin-Redín i sur., 2019). Ultrazvuk se obično širi kao longitudinalni valovi, što znači da se vibracije šire u smjeru kretanja vala. Ovi valovi se sastoje od gustih i rijetkih dijelova, što uzrokuje stvaranje kompresija i razrjeđenja u mediju kroz koji se valovi prenose (Chavan i sur., 2022).

Podjela ultrazvuka može se provesti prema različitim kriterijima. Prvo, ultrazvuk se može podijeliti prema frekvenciji; niska i visoka frekvencija ultrazvuka. Drugo, ultrazvuk se može klasificirati prema primjeni. Medicinski ultrazvuk koristi se za dijagnostiku i terapiju u medicini, dok se tehnički ultrazvuk primjenjuje u inženjerstvu, industriji i istraživanju materijala. I treće, podjela ultrazvuka može se temeljiti na karakteristikama vala. Pulsirajući ultrazvuk karakteriziran je periodičnim intervalima aktivnosti i neaktivnosti zvučnog vala, dok je kontinuirani ultrazvuk stalno prisutan. Fokusirani ultrazvuk koncentrira se u određenom području, dok je ne-fokusirani ultrazvuk raspoređen na šire područje (Gavrilov, 2014).

U prehrambenoj industriji, korištenje ultrazvuka podijeljeno je na dva područja: nisku i visoku razinu energije, ovisno o snazi zvuka (W), intenzitetu zvuka (W/m^2), ili gustoći energije (W/m^3) koja se koristi. Za aplikacije niske energije, preferira se ultrazvučna frekvencija iznad 100 kHz i intenzitet ispod $1 W/cm^2$. Ovi pristupi obično ne mijenjaju fizička ili kemijska svojstva materijala kroz koje prolaze (Bhargava i sur., 2021). Također kod primjene ultrazvuka postoje direktna primjena ultrazvuka ultrazvučnim uređajima sa sondom i indirektno putem ultrazvučne kupelji (Astráin-Redín i sur., 2019).



Slika 1. Ultrazvučni uređaj sa sondom (preuzeto iz: Q700CA Sonicator – Cannasol Technologies)

Kod ultrazvučnih uređaja sa sondom koristi se ultrazvuk visoke frekvencije gdje je ultrazvučna sonda direktno uronjena u čašu s uzorkom (Chavan i sur., 2022). Ultrazvučni uređaj sa sondom omogućava direktan prijenos ultrazvuka u otopinu, koristeći pretvornik smješten na njezinom vrhu za osiguravanje znatno većeg intenziteta ultrazvuka u usporedbi s ultrazvučnim kupeljima (Slika 1). Nadalje, neki od bitnih faktora koji utječu na efikasnost su oblik i promjer sonde, frekvencija, amplituda, vrijeme tretiranja, vrsta uzorka te količina/volumen uzorka (Yusoff i sur., 2022).

Pozitivni aspekti primjene ultrazvuka u prehrambenoj industriji uključuju poboljšanje procesa ekstrakcije, smanjenje vremena obrade i temperature, zadržavanje više hranjivih sastojaka u obrađenim namirnicama te mogućnost pokretanja reakcija bez potrebe za dodatnim kemijskim spojevima. Također, ultrazvuk omogućuje veću učinkovitost u stvaranju emulzija i homogenizaciji, te je siguran, ekološki prihvatljiv. S druge strane, negativni aspekti uključuju visoke troškove implementacije ultrazvučne tehnologije u poslovanje zbog potrebe za prilagođenim opremama, ograničenja u izgradnji velikih ultrazvučnih reaktora, i problem izravnog kontakta između tekućina za obradu i ultrazvučnih sondi koji može zahtijevati alternativne pristupe kako bi se izbjegla kontaminacija. Također, postoji i zabrinutost zbog potencijalnih negativnih utjecaja slobodnih radikala koji se stvaraju tijekom procesa kavitacije (Chavan i sur., 2022).

U kontekstu ultrazvučnih kupelji, longitudinalni valovi ultrazvuka putuju kroz tekućinu i uzrokuju oscilacije tekućih čestica. Ove oscilacije mogu rezultirati stvaranjem kavitacije i mikrostrujanja u tekućini, što je korisno za razne primjene, poput ekstrakcije ili čišćenja. Ultrazvučne kupelji opremljene su pretvornicima smještenim na dnu kupelji, obično ispunjene vodom ili nekom drugom tekućinom (Slika 2). Osim pretvornika bitan dio ultrazvučne kupelji također su generator te sama kupelj.



Slika 2. Ultrazvučna kupelj s grijanjem (medicalexp.com, 2024).

Ultrazvučne kupelji poželjne su zbog pristupačne cijene i jednostavnog održavanja. Sastoje se od spremnika s piezoelektričnim pretvaračima na dnu ili sa strane, koji generiraju zvučne valove koji se šire kroz tekući medij u kojem je uronjen uzorak. Prijenos ultrazvuka je neizravan - ultrazvučni valovi putuju iz piezoelektričnih pretvarača, kroz stijenku laboratorijskog posuđa prije nego što stignu do uzorka (u tekućem mediju) na koji se želi djelovati. Zbog promjene medija i udaljenosti kojom ultrazvučni valovi prolaze, intenzitet ultrazvuka se smanjuje (Wells, 2020). Ovi valovi imaju nisku jačinu te tretman nije ujednačen zbog formiranja čvorova. Koriste se u prehrambenoj industriji za čišćenje, odzračivanje, degaziranje, inaktivaciju enzima i mikroorganizama, te poboljšanje prijenosa tvari (Mason i sur., 2011).

Jedan od efekata ultrazvuka je pojava kavitacije. Kavitacija je fenomen koji se javlja kada tekućina pod utjecajem vanjskih sila, poput ultrazvuka ili brzog strujanja tekućine, stvara mjehuriće plina ili pare u tekućini. Ti se mjehurići formiraju uslijed smanjenja tlaka u tekućini ispod razine na kojoj se para može formirati (Li i sur., 2021). Kada ti mjehurići dosegnu određenu veličinu u području visokog tlaka, oni naglo implodiraju ili kolabiraju, stvarajući ekstremno visoke temperature i pritisak na malom području. Kada mjehurići kavitacije implodiraju blizu površine krutog materijala, stvaraju se mikrostrujanja i udarni valovi zbog visokog tlaka i temperature usmjereni prema toj površini (Suslick i sur., 2018). U prehrambenoj industriji, ovaj učinak se široko koristi

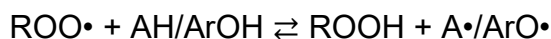
za ekstrakciju spojeva iz biljnih izvora. Kavitacijski mjehurić nastaje blizu površine biljnog materijala, prolazi fazu kompresije i implodira, što uzrokuje usmjeravanje mikrostrujanja i udarnih valova prema površini materijala. Ovaj proces dovodi do razaranja staničnih stijenki i oslobađanja sadržaja u okolni medij/otapalo (Pingret i sur., 2013).

2.4 Antioksidansi i metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidansi su molekule koje sprečavaju oksidaciju drugih molekula te su zbog svoje zaštitne uloge vrlo bitni za prehrambenu industriju. Oni se mogu podijeliti na primarne, koji izravno reagiraju s reaktivnim vrstama kisika i dušika (*reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS)), te sekundarne, koje sprječavaju oksidaciju inhibiranjem oksidacijskih procesa kao što su kelacija metalnih iona i inhibicija enzima koji potiču oksidaciju (Gupta, 2015).

Nadalje, antioksidansi se mogu klasificirati i kao enzimski spojevi, poput superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze, te kao ne-enzimski spojevi, što uključuje vitamine (npr. vitamin C, E), polifenole, flavonoide i druge bioaktivne spojeve (Santos-Sánchez i sur. 2019).

Postoje različite metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti/kapaciteta. Glavna podjela metoda dijeli ih na TVA metode (Transfer vodikovog atoma) i TE metode (transfer elektrona). Testovi temeljeni na prijenosu atoma vodika odnosno TVA metode mjere sposobnost antioksidansa da uklone slobodne radikale doniranjem atoma vodika. TVA mehanizmi djelovanja antioksidansa mogu se prikazati pomoću sljedeće reakcije gdje se atom vodika (H) fenola (ArOH) prenosi na peroksilni radikal (ROO•) čime nastaje ariloksilni radikal (ArO•) koji se stabilizira rezonancijom:



Neke od metoda koje ubrajamo u TVA metode su:

1. ORAC metoda (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala) svrstava se u TVA metode za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. ORAC metoda funkcionira tako da se prvo generiraju slobodni radikali, najčešće peroksilni radikali, pomoću AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) reagensa.

Zatim se u sistem dodaje fluorescein, koji emitira fluorescenciju. Slobodni radikali ulaze u interakciju sa fluoresceinom, smanjujući njegovu fluorescenciju. Kada se dodaju antioksidansi, oni neutraliziraju slobodne radikale, usporavajući smanjenje fluorescencije. Mjerenjem promijene fluorescencije tokom vremena, određuje se antioksidativna sposobnost uzorka, izražena kao Trolox ekvivalent. Mane ORAC metode su te da je postupak analize dugačak, zahtjeva specifične uvjete rada, sklonost varijabilnosti rezultata između različitih laboratorija te zahtjeva opremu za fluorescenciju (Munteanu i sur., 2021).

2. HORAC test (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity): Ova metoda procjenjuje sposobnost uzorka da spriječi stvaranje hidroksilnih radikala koristeći Co(II) kompleks. Uzorak se inkubira s fluoresceinom, nakon čega se dodaje Fentonova smjesa. Mjeri se početna fluorescencija, a očitavanja se provode svake minute. Kalibracijska krivulja izrađuje se pomoću standardnih otopina galne kiseline.
3. TRAP metoda (eng. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*): Temelji se na sposobnosti antioksidansa da inhibiraju reakciju između peroksilnih radikala i odabrane molekule, što se prikazuje kao potrošnja kisika (O_2) tijekom procesa peroksidacije izazvanog toplinskom razgradnjom 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorida (ABAP).
4. TOSC test (eng. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*): Temelji se na inhibiciji stvaranja etilena (kontrolna reakcija prati se plinskom kromatografijom) u prisutnosti antioksidativnih spojeva koji konkuriraju s α -keto- γ -butiotioctenom kiselinom (KMBA) za reaktivne vrste kisika (ROS). Ovaj test koristi površinu ispod krivulje koncentracije etilena u usporedbi s vremenom reakcije (do 300 minuta) (Munteanu i sur., 2021).

Testovi temeljeni na prijenosu jednog elektrona, odnosno testovi prijenosa elektrona (TE), otkrivaju sposobnost antioksidansa da prenese elektron kako bi reducirali metalne ione, karbonilne skupine i slobodne radikale. Testovi temeljeni na TE baziraju se na prijenosu elektrona na ($ROO\cdot$), pri čemu ga pretvaraju u anion (ROO^-). Ovaj proces uzrokuje reverzibilnu deprotonaciju i smanjenje boje u otopini, što istovremeno označava završetak reakcije i ukazuje na koncentraciju antioksidansa

ovisno o obojenju reakcijske otopine (Platzer i sur., 2021). Pod TE metode ubrajamo sljedeće metode:

1. DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) metoda: Mjeri sposobnost ekstrakta da neutralizira slobodne radikale, ocjenjujući njihovu sposobnost doniranja vodikovog atoma.
2. ABTS metoda (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat): Metoda se oslanja na reakciji oksidacije ove molekula (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat), pri čemu dolazi do stvaranja stabilnog radikala, ABTS^{•+}, koji ima intenzivno plavu-zelenu boju.
3. FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda: Ocjenjuje reduktivnu moć ekstrakta, mjeri redukciju Fe³⁺-TPTZ kompleksa u Fe²⁺-TPTZ kompleksu. Mjeri samo sposobnost redukcije željeza, što ne uključuje sve antioksidativne mehanizme, ima osjetljivost na pH vrijednost ekstrakta i može podcijeniti antioksidativnu aktivnost hidrofobnih spojeva.
4. TAC (eng. *Total Antioxidant Capacity*) metoda: Procjenjuje ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakta na temelju elektronskog prijenosa, redukcijom molibdena (VI) u molibden (V) djelovanjem antioksidativnih spojeva.
5. Folin-Ciocalteu: Metoda se temelji na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom, koji sadrži mješavinu fosfomolibdatne i fosfovolframne kiseline. Kada fenolni spojevi reagiraju s ovim reagensom, dolazi do promjene boje zbog redukcije molibdena i volframa iz visokih u niska oksidacijska stanja. Intenzitet plave boje koja se formira proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva u linearnom području mjerenja (0-1).

Svaka metoda ima svoje prednosti i ograničenja. Primjerice, DPPH metoda nije specifična samo za fenolne spojeve i može biti pod utjecajem ne-fenolnih spojeva poput askorbinske kiseline. ABTS metoda, iako slična DPPH, može mjeriti širi spektar antioksidansa ali je osjetljiva na pH vrijednost ekstrakta. FRAP metoda fokusira se na reduktivnu sposobnost, dok TAC metoda pruža sveobuhvatan pogled na ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakta, ali može biti podložna varijacijama zbog različitih profila antioksidativnih spojeva (Apak, 2019). Folin-Ciocalteu metoda ima nisku specifičnost jer ne reagira samo s antioksidansima već i s mnogim drugim redukcijskim

spojevima kao što su proteini, aminokiseline te neki drugi spojevi (Sánchez-Rangel i sur., 2013).

Istraživanja antioksidativnog potencijala često uključuju analizu različitih biljnih ekstrakata ili voćnih kora koristeći više metoda kako bi se dobila sveobuhvatna slika njihove AA. Ove metode često koriste tehnike kao što je LC-MS/MS (eng. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) odnosno tekućinska kromatografija u kombinaciji sa dvostupanjskom masenom spektrometrijom za identifikaciju i karakterizaciju fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina i flavonoida, potvrđujući prisutnost različitih antioksidativnih spojeva (Santos-Sánchez i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kora rajčice

U okviru ovog istraživanja, upotrijebljena je osušena kora rajčice dobivena od partnera s FunTomP projekta. Pripremljeno je ukupno 36 uzorka sušenih kora rajčice, od kojih je 27 bilo upotrijebljeno za ultrazvučnu ekstrakciju, a preostalih 9 uzoraka za konvencionalnu toplinsku ekstrakciju. Uzorci su pripremljeni miješanjem 4,0 g osušene kore rajčice s 100 mL ekstrakcijskog otapala. Kao ekstrakcijsko otapalo korišteni su deionizirana voda te 25 i 50 %-tna otopina etanola.

3.1.2 Kemikalije

1. Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. 25 % otopina etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
3. 50 % otopina etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
4. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl; priprema: 330 μ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) (Carlos Erba reagents, Val-de-Reuil, Francuska) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL deioniziranom vodom te nadopuni do oznake.
5. 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6; priprema: 1,55 g natrijevo g acetata trihidrata (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T.Baker, Gliwice, Poljska) u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
6. 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl₃; priprema: 0,0541 g FeCl₃ × 6 H₂O (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) otopi u 10 mL deionizirane vode, otopina se priprema svježa.
7. 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ; priprema: 0,0312 g TPTZ (Acros, New Jersey, Sjedinjene Američke Države) otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja.
8. Standard željezo (II)-sulfat septahidrat (FeSO₄ × 7H₂O); Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata septahidrat (FeSO₄ × 7H₂O). Odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfat septahidrata (Honeywell, Seelze, Njemačka) u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese s deioniziranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L, te nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

9. FRAP reagens; Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagens (Acros, New Jersey, Sjedinjene Američke Države) i 5 mL FeCl₃ (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (omjer 10:1:1).
10. 0,094 mM DPPH (u 96 % metanolu); Priprema: 7,41 mg DPPH (abcr GmbH, Karlsruhe, Njemačka) otopi se 96 % metanolu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u odmjernoj tikvici od 200 mL te se metanolom nadopuni do oznake.
11. Standard Trolox (1 mM); Priprema: 0,025 g Troloxa (Acros, Danska) otopi se 96 % metanolu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u odmjernoj tikvici od 100 mL te nadopuni do oznake metanolom.

3.1.3 Uređaji

1. Ultrazvučni uređaj Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
2. Mlin s noževima (Retsch GmbH, Haan, Njemačka)
3. Tehnička vaga Highland® Portable Precision Balances HCB 1002 (Adam Equipment, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo)
4. Vorteks uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
5. UV-VIS spektrofotometar UV-2600i (Shimadzu, Kyoto, Japan)
6. Magnetska miješalica (Dlab, Peking, Kina)
7. Ultrazvučna kupelj s grijanjem DT 100 H (Bandelin, Berlin, Njemačka)
8. Vakuum pumpa model Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
9. Testna (klima) komora UN75 (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka)

3.1.4 Laboratorijsko posuđe

1. Laboratorijska čaša
2. Laboratorijska špatula
3. Menzura

4. Odmjerna tikvica
5. Plastične ladice za vaganje
6. Plastične epruvete (Falcon)
7. Stakleni lijevci
8. Termometar
9. Kapaljka
10. Staklene kivete
11. Eppendorf epruveta (epice)
12. Staklene epruvete
13. Büchnerov lijevak
14. Staklene pipete
15. Odsisna boca
16. Metalna žlica
17. Staklene posudice
18. Eksikator

3.2 Metode

3.2.1 Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem do konstantne mase (105 °C)

Staklene posudice se prvo osuše u testnoj (klima) komori na 105 °C kako bi se uklonila vlaga. Nakon sušenja, posudice se izvade i ohlade u eksikatoru oko 20 minuta prije nego što im se izmjeri masa s preciznošću od $\pm 0,0002$ g. Zatim se u ohlađene i izvagane posudice stavi približno 2,5 g uzorka, koji se potom stavlja u testnu (klima) komoru na $105\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ tijekom jednog sata. Nakon sušenja, posudice s uzorkom ohlade se u eksikatoru oko 20 minuta prije nego što se ponovno izmjere. Ovaj postupak se ponavlja za uzastopna sušenja, sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g.

3.2.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta

Spojevi koji imaju antioksidativno djelovanje ekstrahirani su iz osušene kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta. Za ultrazvučnu obradu uzoraka osušene kore rajčice (27 ukupno) korišten je ultrazvuk visokog intenziteta s varijacijama parametara ekstrakcije (vrijeme tretiranja: 3, 6 i 9 minuta, amplituda: 50 %, 75 % i 100 %, te ekstrakcijsko otapalo: deionizirane vode, 25 %-tna otopina etanola i 50 %-tna otopina etanola). Nazivi uzoraka uz pripadajuću primijenjenu amplitudu, trajanje ekstrakcije i ekstrakcijsko otapalo detaljno su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Nazivi ultrazvučno tretiranih uzoraka s pripadajućim ekstrakcijskim parametrima.

Uzorak	Amplituda	Vrijeme tretiranja	Udio etanola	Masa	T ₀ *	T ₁ **
	%	min	%	g	°C	°C
TU 1	50	6	25	4,01	21	36
TU 2	100	3	25	4,00	20	30
TU 3	50	9	0	4,00	16	23
TU 4	75	3	25	4,01	21	30
TU 5	75	6	50	3,99	20	41
TU 6	100	3	50	4,02	21	37
TU 7	50	3	0	4,00	17	24
TU 8	100	3	0	4,01	17	40
TU 9	75	9	50	4,03	17	44
TU 10	50	3	50	4,03	19	29
TU 11	100	9	25	4,01	21	31
TU 12	100	6	0	4,00	18	53
TU 13	100	6	25	4,02	21	40
TU 14	75	6	0	3,99	18	25
TU 15	50	3	25	4,02	19	23
TU 16	50	6	50	4,02	20	38
TU 17	50	9	25	4,01	20	25
TU 18	100	9	0	4,02	19	33
TU 19	50	9	50	4,02	16	35
TU 20	75	9	0	3,99	20	35
TU 21	75	6	25	4,01	21	28
TU 22	75	3	0	4,00	20	37
TU 23	75	9	25	3,99	21	38
TU 24	100	9	50	4,01	19	53
TU 25	50	6	0	4,01	20	39
TU 26	100	6	50	3,99	23	50
TU 27	75	3	50	4,02	19	36

* - temperatura uzoraka izmjerena prije ultrazvučne ekstrakcije

** - temperatura uzoraka izmjerena neposredno po završetku ultrazvučne ekstrakcije

Postupak izvođenja ultrazvučne ekstrakcije, primjenom ultrazvuka visokog intenziteta:

4 grama usitnjenog uzorka s točnošću $\pm 0,01$ g odvažuje se, na tehničkoj vagi, u laboratorijsku čašu od 250 ml te se ovisno u uzorku, doda 100 ml odgovarajućeg otapala. Zatim se čaša postavi u plastičnu posudu s ledom i hladnom vodom, smještenu u kućište ultrazvučnog uređaja. U čašu se postavi ultrazvučna sonda i termočlanak za mjerenje temperature. Sonda je smještena u sredini čaše s uzorkom, a termočlanak tako da ne dodiruje ni sondu ni stijenke čaše. Nakon zatvaranja zvučno izoliranog kućišta, na zaslonu upravljačke jedinice se postavlja željena amplituda i trajanje tretmana te se pokreće tretman ultrazvukom visokog intenziteta. Po završetku ekstrakcije ultrazvukom, slijedi vakuum filtracija. Uzorak se uz pomoć vakuum pumpe filtrira preko Büchnerovog lijevka. Po završetku filtracije, ekstrakti se do provođenja kemijskih analizi čuvaju na hladnome u hladnjaku pri temperaturi od $+4$ °C.

3.2.3 Toplinska ekstrakcija

Uz ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, provedena je i toplinska ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz osušene kore rajčice na temperaturi od 60 °C. Toplinski se tretman provodio na devet uzoraka, koristeći ultrazvučnu kupelj za zagrijavanje uzoraka. Prilikom zagrijavanja mogućnosti soniciranja bila je isključena. Uzorci su označeni prema trajanju toplinskog tretmana te prema primijenjenom ekstrakcijskom otapalu. Navedeno je prikazano u Tablici 4.

Tablica 4. Nazivi toplinski tretiranih uzoraka s pripadajućim ekstrakcijskim parametrima.

Uzorak	Vrijeme tretiranja	Udio etanola	Masa
	min	%	g
T0/3	3	0	4,02
T0/6	6	0	3,99
T0/9	9	0	4,00
T25/3	3	25	4,00
T25/6	6	25	4,00
T25/9	9	25	4,02
T50/3	3	50	4,02
T50/6	6	50	4,01
T50/9	9	50	4,02

Postupak provođenja toplinske ekstrakcije:

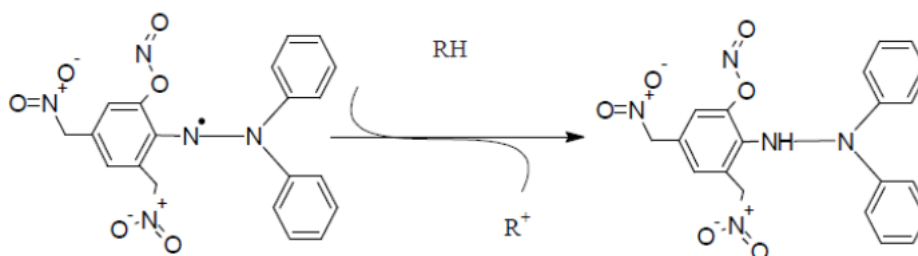
Na tehničkoj vagi odmjeri se 4 grama usitnjenog uzorka s točnošću od $\pm 0,01$ g. Uzorak se potom prenese u laboratorijsku čašu zapremine 250 ml. Ovisno o uzorku, u čašu se doda 100 ml odgovarajućeg otapala. Čaša s uzorkom i otapalom postavlja se u ultrazvučnu kupelj. Termometrom je praćen porast temperature uzorka unutar čaše, a kada je postignuta temperatura od 60 °C, započeto je mjerenje vremena tretiranja uz miješanje. Nakon provedene toplinske ekstrakcije, izvršena je vakuum filtracija uzoraka. Postupak je proveden na isti način kao i kod uzoraka tretiranih ultrazvukom. Nakon filtracije, ekstrakti se čuvaju na hladnom mjestu u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C do provođenja kemijskih analiza .

3.2.4 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala unutar metanolne otopine. DPPH radikal, zbog prisutnosti nesporenog elektrona, pokazuje intenzivnu apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). Međutim, u

prisutnosti elektron-donora (AH), koji djeluje kao antioksidans "gasitelj" slobodnih radikala, dolazi do stabilizacije DPPH radikala kroz sparivanje elektrona. To rezultira promjenom boje otopine iz ljubičaste (što je oksidirani oblik radikala) u žutu boju (reducirani oblik radikala) (Slika 3). Ova promjena mjeri se promjenom apsorbancije reakcijske smjese tijekom određenog vremena, uspoređujući ju s istim efektom postignutim korištenjem poznatog reducenta Trolox-a (Brand-Williams i sur., 1995).



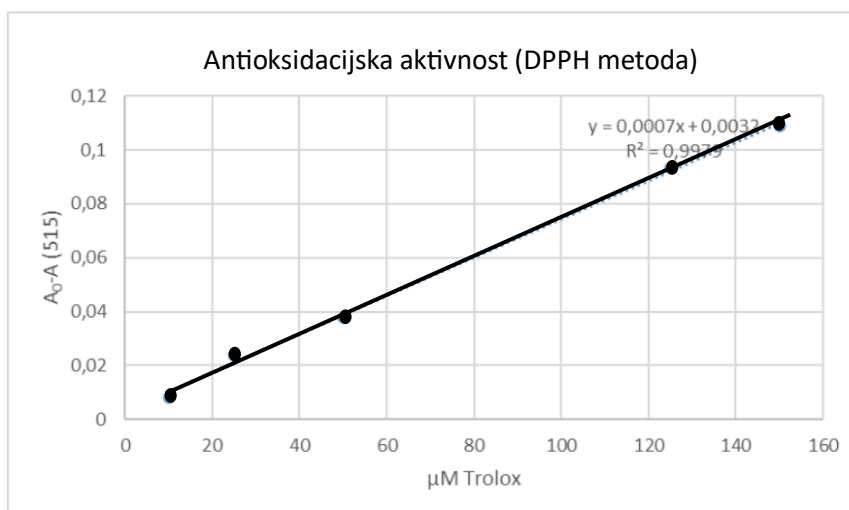
Slika 3. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom (Brand-Williams i sur., 1995)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Zatim se u epruvetu doda 100 μ L ekstrakta (po potrebi razrijeđenog) i 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Smjesa se vorteksira, a reakcija se provodi 30 minuta u tami kako bi se postiglo ravnotežno stanje. Nakon postizanja ravnotežnog stanja izmjeri se apsorbancija pripremljenih uzoraka pri 515 nm. Slijepa proba umjesto ekstrakta sadržava metanol, a sam postupak provođenja reakcije je isti.

Baždarni dijagram:

Iz 1 mM izvorne otopine standarda Trolox-a, uzima se određeni volumen za pripremu razrjeđenja od 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 125 μ M i 150 μ M. Za svako razrjeđenje se redom odpipetira 100 μ L, 250 μ L, 500 μ L, 1250 μ L i 1500 μ L izvorne otopine Trolox-a, nakon čega se do oznake od 10 mL nadopuni s 96 % metanolom (Slika 4). Zatim se ponavlja prethodno opisani postupak reakcije s DPPH radikalom, ali umjesto ekstrakta, u reakcijsku smjesu dodaje se 100 μ L pripremljenih razrjeđenja standarda Trolox-a.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a (µM)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0007 X + 0,0032$$

$$R^2 = 0,9979$$

gdje je: Y = apsorbancija pri 515 nm, X = ekvivalent Trolox-a (µM)

3.2.5 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip metode

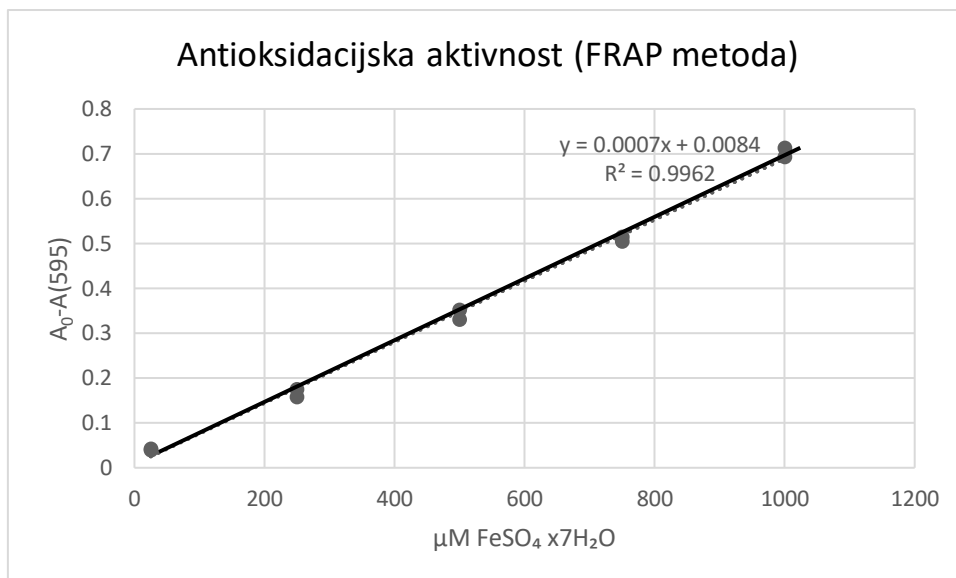
Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil- s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi sa nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

Princip rada

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižoj pH vrijednosti. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancija pri 595 nm. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ ekvivalenta (FE)/mL uzorka.

Izrada baždarnog dijagrama

Za pripremu baždarnog pravca (Slika 5) pripremi se 100 mL 1 mM otopine željezo (II)-sulfata septahidrata iz koje se onda pripreme razrjeđenja u koncentracijama od 25, 250, 500, 750 i 1000 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0,25; 2,5; 5,0; 7,5 i 10 mL 1 mM otopine željezo (II)-sulfata septahidrata te do oznake nadopuni deioniziranom vodom. U odmjerne tikvice od 10 mL redom se odpipetira 240 μL deionizirane vode, 80 μL otopine standarda točno određene koncentracije i 2080 μL FRAP reagensa, kratko promiješa na vortex uređaju, te 5 se minuta termostatira na temperaturi od 37 °C u kupelji. Zatim se mjeri apsorbancija pri 595 nm. Slijepa proba sadrži sve osim ekstrakta, umjesto kojeg se dodaje deionizirana voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se pomoću računalnog programa (Microsoft Office Excel) baždarni dijagram s vrijednostima koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) na osi apscisi i vrijednostima apsorbancije na osi ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o vrijednosti koncentracije FeSO₄×7H₂O (µM)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 6,81142 \cdot 10^{-4} X + 0,00843793$$

$$R^2 = 0,99617$$

Gdje je: Y = apsorbancija pri 595 nm, X = ekvivalent Fe²⁺ (µM)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj istraživanja je utvrditi i optimirati postupak ultrazvučne ekstrakcije, te posljedično utvrditi vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata. Postupak je putem prethodno spomenutih metoda (praćenje apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu) u odnosu na isti učinak koji se postiže primjenom poznatog reducensa. U sklopu eksperimenta provedene su dvije različite metode koje se baziraju na različitim kemijskim reakcijama. Za ekstrakcije (obradu) 27 uzoraka korišten je ultrazvuk visokog intenziteta s varijacijama parametara ekstrakcije: (vrijeme tretiranja: 3, 6 ili 9 minuta, amplituda: 50 %, 75 % ili 100 %, te primijenjeno ekstrakcijsko otapalo: deionizirana vode, 25 % i 50 % otopina etanola). Nadalje, 9 uzoraka podvrgnuto je toplinskom tretmanu koristeći ultrazvučnu kupelj za zagrijavanje uzoraka, no bez mogućnosti soniciranja. Uslijed toplinske ekstrakcije izmjenjivala su se dva ekstrakcijska parametra (vrijeme tretmana: 3, 6 ili 9 minuta te primijenjeno ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda, 25 % i 50 % otopina etanola). Prikupljeni podatci statistički su obrađeni uz pomoć softvera STATGRAPHICS Centurion XV StatPoint (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, SAD).

4.1 Rezultati mjerenja

Tablica 5. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (AA) određene FRAP i DPPH metodom, prije i nakon skladištenja za uzorke koji su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	Amplituda	Vrijeme tretiranja	EtOH	AA FRAP	AA FRAP nakon 7 dana	AA DPPH	AA DPPH Nakon 7 dana
	%	min	%	[$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]
TU 1	50	6	25	21,85 ± 0,01	17,66 ± 10,09	6,02 ± 0,02	6,80 ± 0,07
TU 2	100	3	25	25,89 ± 0,27	21,31 ± 0,25	7,45 ± 0,92	5,61 ± 0,10
TU 3	50	9	0	12,45 ± 0,06	10,95 ± 0,27	1,14 ± 0,48	5,17 ± 0,10
TU 4	75	3	25	22,80 ± 2,17	21,06 ± 0,09	6,86 ± 0,24	6,36 ± 0,12
TU 5	75	6	50	23,92 ± 0,33	23,01 ± 0,23	6,34 ± 0,66	4,09 ± 0,48
TU 6	100	3	50	18,74 ± 0,76	20,04 ± 0,10	5,74 ± 0,24	5,20 ± 0,23
TU 7	50	3	0	10,96 ± 0,09	11,14 ± 0,36	4,35 ± 0,03	4,19 ± 0,27
TU 8	100	3	0	11,80 ± 0,31	9,87 ± 0,05	4,22 ± 0,01	2,77 ± 0,13
TU 9	75	9	50	26,24 ± 0,23	27,31 ± 0,31	6,14 ± 0,09	6,08 ± 0,89
TU 10	50	3	50	14,95 ± 0,07	15,35 ± 0,13	1,90 ± 1,33	0,39 ± 0,36
TU 11	100	9	25	23,71 ± 0,88	26,42 ± 0,19	7,51 ± 0,36	6,60 ± 0,09
TU 12	100	6	0	15,72 ± 0,57	10,62 ± 0,20	3,54 ± 0,26	4,66 ± 0,22
TU 13	100	6	25	25,02 ± 2,43	29,75 ± 1,01	4,40 ± 0,13	7,52 ± 0,09
TU 14	75	6	0	12,36 ± 0,68	12,03 ± 0,06	4,74 ± 0,14	2,51 ± 0,14

TU 15	50	3	25	1,09 ± 0,04	1,45 ± 0,02	0,38 ± 0,00	0,43 ± 0,01
TU 16	50	6	50	17,14 ± 0,65	18,98 ± 0,26	5,86 ± 0,03	3,14 ± 0,01
TU 17	50	9	25	23,61 ± 0,98	28,04 ± 0,78	5,72 ± 0,52	5,61 ± 0,61
TU 18	100	9	0	12,29 ± 0,34	9,10 ± 0,24	4,19 ± 0,35	3,58 ± 0,02
TU 19	50	9	50	28,44 ± 8,17	21,65 ± 0,71	6,07 ± 0,12	2,48 ± 0,13
TU 20	75	9	0	13,64 ± 0,52	10,69 ± 0,00	3,96 ± 0,39	3,61 ± 0,03
TU 21	75	6	25	27,13 ± 2,00	26,52 ± 0,92	7,81 ± 0,31	6,24 ± 0,41
TU 22	75	3	0	11,49 ± 0,03	9,38 ± 0,29	1,67 ± 0,21	4,91 ± 0,14
TU 23	75	9	25	20,29 ± 0,12	27,61 ± 1,48	8,54 ± 0,46	7,05 ± 0,34
TU 24	100	9	50	24,74 ± 1,00	28,91 ± 0,14	7,45 ± 0,06	2,91 ± 0,61
TU 25	50	6	0	8,90 ± 0,09	10,33 ± 0,10	4,85 ± 0,17	2,27 ± 0,34
TU 26	100	6	50	21,34 ± 0,71	25,23 ± 0,53	3,53 ± 0,23	3,96 ± 0,16
TU 27	75	3	50	16,83 ± 0,57	14,65 ± 3,20	3,98 ± 0,47	1,27 ± 0,22

Za ekstrakte dobivene obradom uzoraka sa ultrazvukom visokog intenziteta rezultati pokazuju da prije skladištenja najveći antioksidacijski kapacitet pri određivanju primjenom FRAP metode ima uzorak TU 19 (vrijeme tretiranja: 9 minuta, amplituda: 50 %, te primijenjeno ekstrakcijsko otapalo: 50 % otopina etanola) i iznosi $28,44 \pm 8,17$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Nasuprot tome, najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti zabilježena je kod uzorka TU 15 (vrijeme tretiranja: 3 minute, amplituda: 50 %, te primijenjeno ekstrakcijsko otapalo: 25 % otopina etanola) i iznosi $1,09 \pm 0,04$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Nakon 7 dana skladištenja u hladnjaku pri $+4$ °C primjenom FRAP metode određeno je najveći pad u AA koji iznosi 32,44 % kod uzorka TU 12 (amplituda 100 %, vrijeme tretiranja 6 min, ekstrakcijsko otapalo deionizirana voda).

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka izmjerenih primjenom DPPH metode razlikuju se od onih izmjerenih FRAP metodom. Ovom metodom dobiveno je to da najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta prije skladištenja pokazuje uzorak TU 23 (amplituda: 75 %; vrijeme tretiranja: 9 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola) i iznosi $8,54 \pm 0,46$ $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Nasuprot tomu, najmanja izmjerena vrijednost prije skladištenja uočena je kod uzorka TU 15 (amplituda:50 %; vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola). Nakon 7 dana skladištenja najveći pad u AA određen DPPH metodom iznosi 79,47 % kod uzorka TU 10 (amplituda: 50 %; vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola).

Promatranjem rezultata može se zaključiti da je najveći AA kod uzoraka prije skladištenja postignut s 9 minuta tretiranja neposredno nakon ultrazvučne ekstrakcije. Rezultati su u skladu s istraživanjem Al-Dhabi i sur. (2017) u kojem se proučavala ovisnost prinosa ukupnih fenola iz upotrijebljenog taloga kave tretiranog ultrazvukom visokog intenziteta o vremenu tretiranja. Oni su primijetili da u početnim fazama ekstrakcije prinos fenolnih spojeva povećava s produljenjem trajanja tretmana. To je posljedica kombinacije kavitacije i porasta temperature, što uzrokuje bubrenje biljnog matriksa i povećanje pora u staničnoj stijenci.

Nakon skladištenja, antioksidativna vrijednost uzoraka, određena FRAP metodom, pokazala je pad u rasponu od 2,25 % do 32,44 %. Najmanji pad zabilježen je kod uzorka TU 21 (amplituda: 75 %; vrijeme tretiranja: 6 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola) koji iznosi 2,25 %, dok je najveći pad zabilježen kod uzorka TU 12 (amplituda:100 %; vrijeme tretiranja: 6 minuta i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana

voda) sa smanjenjem od 32,44 %. Također, antioksidativna vrijednost određena metodom DPPH pokazala je smanjenje nakon skladištenja, u rasponu od 0,98 % do 79,47 %. Najmanji pad zabilježen je kod uzorka TU 9 (amplituda: 75 %; vrijeme tretiranja: 9 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola), što iznosi 0,98 %, dok je najveći pad zabilježen kod uzorka TU 10 (amplituda: 50 %; vrijeme tretiranja: 3 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola) sa smanjenjem od 79,47 %.

FRAP metodom je utvrđeno da je najveći porast AA zabilježen kod uzorka TU 26 (amplituda: 100 %; vrijeme tretiranja: 6 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola) i to za 10,6 %. DPPH metodom utvrđeno je da najveći porast AA zabilježen kod uzorka TU 23 (amplituda: 75 %; vrijeme tretiranja: 9 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola) i to za 26,5 %. Al-Weshahy i sur. (2013) su u svom radu proučavali utjecaj različitih perioda skladištenja na AA u kori krumpira kod dva kultivara (Penta i Marcy). U navedenom radu uočili su rast AA od drugog tjedna skladištenja i sve do osmog tjedna, bez obzira na temperaturu skladištenja. Ovo povećanje objašnjavaju proizvodnjom glikoalkaloida kao odgovora na stres tijekom skladištenja, a koji imaju antioksidativna svojstva. Glikoalkaloidi također mogu nastati i rajčice kao odgovor na stres nastao u stanicama tijekom skladištenja.

Sharmin i sur. (2016) proveli su istraživanje gdje je analiziran utjecaj različitih otapala (vode, metanola, etanola, acetona, heksana i petrolejskog benzina), temperatura (20 °C do 95 °C) i vremena tretiranja (5 minuta do 60 minuta) na uzorcima iz kore nara, mrkve i rajčice. Povećanjem vremena ekstrakcije povećava se i antioksidacijska vrijednost uzoraka s obzirom na veću količinu ekstrahiranih antioksidanasa (Sharmin i sur., 2016). U tablici 4. vidljivo je da u većini uzoraka antioksidativna vrijednost raste sa duljinom tretmana gdje u prosjeku uzorci na kojima je tretman proveden kroz 9 minuta imaju najveću AA. Nadalje porastom vrijednosti amplitude korištene u pokusu doći će do najbolje ekstrakcije tvari koje imaju antioksidativno djelovanje (Kumcuoglu i sur., 2013). Dobivene vrijednosti u našem pokusu se u većini uzoraka poklapaju sa prijašnjom tvrdnjom da je pri maksimalnoj amplituda osigurana veća antioksidativna vrijednost uzorka izuzet uzoraka u kojima je kao ekstrakcijsko otapalo korištena deionizirana voda. Svi uzorci u kojima je ekstrakcijsko otapalo deionizirana voda te je za ekstrakciju korišten ultrazvuk visokog

intenziteta postignute su niže antioksidacijske vrijednosti. Međutim tome nije uvijek takav slučaj, kao što vidimo u radu (Sharmin i sur., 2016) gdje navode da je deionizirana voda učinkovitija od etanola u ekstrakciji antioksidativnih komponenti iz kore rajčice. Tijekom skladištenja dolazi do degradacije antioksidativnih komponenti (Sharmin i sur., 2016). Uslijed degradacije različitih komponenti u našim uzorcima tijekom perioda skladištenja doći će do opadanja antioksidacijske aktivnosti što i potvrđuju dobivene vrijednosti.

Pomoću p-vrijednosti se prikazuje utjecaj ulaznih varijabli koje su u našem slučaju: amplituda, vrijeme tretiranja, udio etanola u otopini te vrijeme skladištenja kao i interakcije ulaznih varijabli (npr. AB ili CD) na izlaznu varijablu koja je u našem eksperimentu bila antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom i DPPH metodom. U slučaju da ulazna varijabla ili interakcija varijabli, ima p-vrijednost manju od 0,05 to ukazuje da se značajno razlikuje od nule na pouzdanoj razini vjerojatnosti od 95 % te se smatra statistički značajnim. U tablici 6. su te vrijednosti označene crvenom bojom. Tablice varijanci iz kojih su uzete p-vrijednosti za uzorke tretirane ultrazvukom visokog intenziteta prikazane su u prilogu 1 i prilogu 2.

Tablica 6. Utjecaj ulaznih varijabli (A-amplituda, B- vrijeme tretiranja, C-udio etanola, D-vrijeme skladištenja, AA-kvadratna interakcija amplitude, AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC- interakcija amplitude i udjela etanola, AD- interakcija amplitude i vremena skladištenja BB- kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, BD- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, CC- kvadratna interakcija udjela etanola, CD-interakcija udjela etanola i vremena skladištenja) na izlaznu vrijednost antioksidacijske aktivnosti (izmjerenu DPPH i FRAP metodom) ultrazvučno tretiranih uzoraka.

Ulazna varijabla	p-vrijednost (DPPH metoda)	p-vrijednost (FRAP metoda)
A	0,0508	0,0024
B	0,0029	0
C	0,5657	0
D	0,2327	0,9468
AA	0,0688	0,1336
AB	0,277	0,0252
AC	0,6726	0,5664
AD	0,5944	0,6222
BB	0,2471	0,1243
BC	0,0305	0,0055
BD	0,4853	0,706
CC	0,0001	0
CD	0,1583	0,3203

*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti (p-vrijednost<0,05)

U slučaju kada je provedena DPPH metoda tri učinka imaju p-vrijednosti manju od 0,05 što ukazuje da su značajno različiti od nule na razini pouzdanosti od 95,0 %. Ta tri učinka su vrijeme tretiranja, interakcija vremena tretiranja i udio etanola te kvadratna interakcija udjela etanola. Na uzorcima na kojima je provedena FRAP metoda uočeno je šest p-vrijednosti manjih od 0,05. Učinci parametra pri kojima su

dobivene te p-vrijednosti su: amplituda, vrijeme tretiranja, udio etanola, međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, međusobna interakcija vremena tretiranja i udjela etanola te kvadratna interakcija udjela etanola.

Statistička značajnost vremena tretiranja kao ulazne varijable može se povezati sa dobivenim AA prije skladištenja gdje je kod uzoraka koji su tretirani najkraće, odnosno 3 minute zabilježena najmanja AA dok su također i najveće AA vrijednosti prije skladištenja određene kod uzoraka koji su tretirani 9 minuta. Ovi podaci ukazuju na to da dulje trajanje tretmana povećava antioksidativnu aktivnost kod uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta.

Sharmila i sur. (2016) u svom istraživanju optimizirali su ekstrakciju fenolnih spojeva iz listova *Cassia auriculata* analizirajući različite uvjete ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta, uključujući vrijeme tretiranja, koncentraciju otapala, intenzitet ultrazvuka i pH. Njihovi rezultati također ukazuju na statističku značajnost vremena tretiranja za uzorke analizirane metodom DPPH, dok su za uzorke analizirane metodom FRAP uočili značajnost vremena tretiranja i udjela etanola.

Moguće je predvidjeti okvirnu vrijednost AA i upravljati parametrima procesa ovisno o željenim rezultatima. Jednadžba regresije za antioksidativnu aktivnost, prikazana ispod Tablice 7., ilustrira kako se ponaša polinom izrađen na temelju obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude, vremenu tretiranja, udio etanola i vremenu skladištenja. Promjenom jedne varijable, mijenja se rezultat jednadžbe odnosno AA, što omogućuje predviđanje izlaznih vrijednosti prilikom dizajniranja eksperimenta. To olakšava prilagođavanje eksperimentalnih parametara prema željenim potrebama te omogućava postizanje maksimalne iskorištenosti cijelog eksperimenta.

Tablica 7. Rezultati optimizacije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta (analiza DPPH metodom)

Faktor	Niska vrijednost	Visoka vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplituda	50	100	75,9071
Vrijeme tretiranja	3	9	8,97978
Udio etanola	0	50	32,5909
Vrijeme skladištenja	0	7	$4,14 \cdot 10^{-7}$

Jednadžba regresije: AA (DPPH metoda) = $-9,05907 + 0,248 \cdot \text{Amplituda} + 1,19264 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,113744 \cdot \text{Udio etanola} + 0,0189153 \cdot \text{Vrijeme skladištenja} - 0,00139156 \cdot \text{Amplituda}^2 - 0,00483333 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,000224 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Udio etanol} + 0,00164762 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme skladištenja} + 0,0607099 \cdot \text{Vrijeme tretiranja}^2 + 0,00983889 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \text{Udio etanol} - 0,0180159 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \text{Vrijeme skladištenja} - 0,00335822 \cdot \text{Udio etanol}^2 - 0,0044127 \cdot \text{Udio etanol} \cdot \text{Vrijeme skladištenja}$

Rezultati optimizacije ukazuju da će se optimalna vrijednost AA koja iznosi $7,8412 \mu\text{mol Trolox/g}_{\text{s.tv.}}$ postići pri optimalnim parametrima (amplitudi: 75,9071 %, vrijeme tretiranja: 8,98 minuta, ekstrakcijsko otapalo: 32,5909 %-tna otopina etanola te vrijeme skladištenja: $4,14 \cdot 10^{-7}$ dana). Optimalna vrijednost koja je gore navedena je dobivena na način da su optimalni uvjeti uneseni u jednadžbu regresije koja se nalazi ispod Tablice 7.

Tablica 8. Rezultati optimizacije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta (FRAP metoda analize)

Faktor	Niska vrijednost	Visoka vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplituda	50	100	81,1823
Vrijeme tretiranja	3	9	9
Udio etanola	0	50	43,3981
Vrijeme skladištenja	0	7	6,99

Jednadžba regresije: AA (FRAP metoda) = $-26,4026 + 0,641817 \cdot \text{Amplituda} + 4,63819 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,35601 \cdot \text{Udio etanol} - 0,620556 \cdot \text{Vrijeme skladištenja} - 0,00287867 \cdot \text{Amplituda}^2 - 0,0257722 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme tretiranja} + 0,000768667 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Udio etanol} + 0,00385079 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme skladištenja} - 0,205 \cdot (\text{Vrijeme tretiranja})^2 + 0,0325222 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \text{Udio etanol} + 0,0245503 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} \cdot \text{Vrijeme skladištenja} - 0,00877867 \cdot (\text{Udio etanol})^2 + 0,00780317 \cdot \text{Udio etanol} \cdot \text{Vrijeme skladištenja}$

Rezultati optimizacije kod uzoraka koji su podvrgnuti FRAP metodi ukazuju da će se optimalna vrijednost AA koja iznosi $29,125 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv}}$ postići pri optimalnim uvjetima (amplitudi: 81,1823 %, vrijeme tretiranja: 9 minuta, ekstrakcijsko otapalo: 43,3981 %-tna otopina etanola te vrijeme skladištenja: 6,99 dana). Optimalna vrijednost koja je gore navedena je dobivena na način da su optimalni uvjeti uneseni u jednadžbu regresije koja se nalazi ispod Tablice 8. Također za bolje razumijevanje statističke značajnosti odnosno utjecaja različitih parametara na AA prikazani su i Pareto dijagram i dijagram odzivne površine koji se nalaze u Prilog 9, Prilogu 10, Prilogu 11 i Prilogu 12.

U tablici 9. prikazane su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti toplinski tretiranih uzoraka. Dobivene vrijednosti određene su primjenom FRAP i DPPH metoda. Također

u tablici 9. vidljive su izmjerene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti tih istih uzoraka nakon skladištenja u hladnjaku pri +4 °C u vremenskom periodu od 7 dana te su za to opet korištene iste dvije metode koje su navedene gore.

Tablica 9. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (AA) toplinski tretiranih uzoraka određene FRAP i DPPH metodom, prije i nakon skladištenja

Uzorak	AA FRAP	AA FRAP nakon 7 dana	AA DPPH	AA DPPH Nakon 7 dana
	[$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]	[$\mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$]
T 0/3	27,45 ± 0,11	30,6 ± 0,98	9,8 ± 0,24	3,9 ± 0,16
T 0/6	30,78 ± 0,24	29,41 ± 0,53	9,65 ± 0,09	5,85 ± 0,29
T 0/9	26,59 ± 0,09	27,85 ± 0,03	8,74 ± 0,07	4,91 ± 0,01
T 25/3	33,34 ± 1,04	35,76 ± 0,47	8,38 ± 0,54	7,89 ± 0,3
T 25/6	32,31 ± 0,45	34,41 ± 0,26	8,62 ± 0,28	8,55 ± 0,35
T 25/9	34,5 ± 0,42	37,36 ± 1,78	8,95 ± 0,08	7,22 ± 0,87
T 50/3	29,71 ± 0,02	29,32 ± 1,04	6,91 ± 0,22	5,33 ± 1,56
T 50/6	30,34 ± 0,54	29,19 ± 1,11	6,97 ± 0,11	6,65 ± 0,28
T 50/9	31,21 ± 0,57	28,22 ± 0,59	8,62 ± 0,22	7,71 ± 0,04

Provođenjem FRAP metode dobili su se rezultati koji prikazuju da i prije i nakon skladištenja najveću antioksidativnu aktivnost ima uzorak T25/9 (vrijeme tretiranja: 9 minuta ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina etanola). Najmanju vrijednost AA prije skladištenja ima uzorak T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minuta i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda).

Nakon provođenja DPPH metode prije skladištenja na ovim uzorcima pokazalo se da uzorak T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minuta i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda) ima najveću AA aktivnost dok najmanji AA pokazao je uzorak T50/3 (vrijeme tretiranja: 3 minuta ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola).

Nakon skladištenja, AA uzoraka koji su toplinski tretirani, određena metodom DPPH, pokazala je pad u rasponu od 0,81 % do 60,2 %. Najmanji pad zabilježen je kod uzorka T25/6 (vrijeme tretiranja: 6 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 25 %-tna otopina

etanola), koji iznosi 0,81 %, dok je najveći pad zabilježen kod uzorka T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda), sa smanjenjem od 60,2 %. Također, AA određena metodom FRAP pokazala je smanjenje nakon skladištenja, u rasponu od 1,31 % do 9,58 %. Najmanji pad zabilježen je kod uzorka T50/3 (vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola), što iznosi 1,31 %, dok je najveći pad zabilježen kod uzorka T50/9 (vrijeme tretiranja: 9 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola), sa smanjenjem od 9,58 %.

Kod određivanja AA pomoću FRAP metode ekstremi pada nakon skladištenja su bili kod uzoraka u kojima je kao otapala bila 50 % otopina etanola samo sa razlikom u duljini tretiranja gdje je najmanji pad bio kod uzorka sa minimalnim tretiranjem od 3 minute dok je najveći pad kod uzorka sa najduljim tretiranjem od 9 minuta. Brglez Mojzer i sur. (2016) u svom radu u kojem su ispitivali različite uvjete ekstrakcije na AA u ružmarinu (*Rosmarinus officinalis*) su ustvrdili da povećano vrijeme tretiranja pridonosi padu u AA uslijed degradacije komponenata odgovornih za AA što je u skladu sa našim dobivenim rezultatima.

DPPH metodom je također utvrđeno da nakon skladištenja u hladnjaku kod svih uzoraka je utvrđen pad u AA dok je FRAP metodom utvrđen rast AA od 11,48 % kod uzorka T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda). Rast AA uočen nakon 7 dana skladištenja u hladnjaku, detektiran samo kod uzoraka obrađenih FRAP metodom, može se objasniti ograničenjima FRAP metode, poput osjetljivosti na pH vrijednost. Promjena pH u rajčici mogla je dovesti do uočavanja vrijednosti viših od stvarnih (Apak, 2019). Također, moguće je da je rast AA rezultat pogreške prilikom pripreme uzoraka i kemikalija.

U tablici 10. prikazane su p-vrijednosti za uzorke na kojima je napravljena toplinska ekstrakcija u kupelji a koji su kasnije podvrgnuti FRAP metodi i DPPH metodi. Za razliku od situacije kada se koristila ultrazvučna ekstrakcija gdje su bile četiri ulazne varijable kao što je vidljivo u tablici 6. u ovom slučaju su tri ulazne varijable, a to su vrijeme tretiranja, udio etanola i vrijeme skladištenja. Statistički značajne ulazne varijable u tablici 10. označene su crvenom bojom. Tablice varijanci iz kojih su uzete p-vrijednosti za uzorke tretirane toplinskom ekstrakcijom prikazane su u prilogu 3 i prilogu 4.

Tablica 10. Utjecaj ulaznih varijabli (A-vrijeme tretiranja, B- udio etanola, C-vrijeme skladištenja, AA- kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, AC- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, BB- kvadratna interakcija udjela etanola, BC-interakcija udjela etanola i vremena skladištenja) na izlaznu vrijednost antioksidacijske aktivnosti (izmjerenu DPPH i FRAP metodom) toplinski tretiranih uzoraka.

Ulazna varijabla	P-vrijednost (DPPH metoda)	P-vrijednost (FRAP metoda)
A	0,26	0,9409
B	0,8449	0,3918
C	0,0012	0,4363
AA	0,4763	0,9265
AB	0,1563	0,4269
AC	0,6581	0,5099
BB	0,034	0,0001
BC	0,0097	0,2317

*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti (p-vrijednost<0,05)

U slučaju kada je provedena DPPH metoda na uzorcima koji su podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji pokazalo se da tri vanjska učinka imaju p-vrijednosti manje od 0,05. Ta tri učinka su vrijeme skladištenja, interakcija vremena skladištenja i udjela etanola te kvadratna interakcija udjela etanola. Dok kod uzoraka na kojima je provedena FRAP metoda kao što je vidljivo iz tablice 10. statističku značajnost ima samo jedna ulazna varijabla i to je kvadratna interakcija udjela etanola.

Na dobivenim rezultatima nakon provedene statističke obrade uočeno je da vrijeme skladištenja ima statistički značaj kod uzorak na kojima je provedena DPPH metoda jer je kod tih uzoraka utvrđen puno veći pad u AA vrijednosti nakon skladištenja

nego kod onih na kojima je provedena FRAP metoda. Paretovi dijagrami kao i dijagrami odzivne površine za oba slučaja koji također potvrđuju statističku pouzdanost gore navedenih tvrdnji nalaze se u Prilogu 5., Prilogu 6, Prilogu 7. i Prilogu 8. .

Tablica 6. Rezultati optimizacije toplinske ekstrakcije (analiza DPPH metodom)

Faktor	Niska vrijednost	Visoka vrijednost	Optimalna vrijednost
Vrijeme tretiranja	3,000	9,000	5,972
Udio etanola	0,000	50,000	14,915
Vrijeme skladištenja	0,000	7,000	$2,669 * 10^{-7}$

Jednadžba regresije: AA (DPPH) = $8,52611 + 0,364167 * \text{Vrijeme tretiranja} + 0,0152 * \text{Udio etanol} - 0,622381 * \text{Vrijeme skladištenja} - 0,0390741 * (\text{Vrijeme tretiranja})^2 + 0,0069 * \text{Vrijeme tretiranja} * \text{Udio etanol} + 0,0119048 * \text{Vrijeme tretiranja} * \text{Vrijeme skladištenja} - 0,00189067 * (\text{Udio etanola})^2 + 0,0102095 * \text{Udio etanola} * \text{Vrijeme skladištenja}$

Moguće je predvidjeti okvirnu vrijednost AA kod uzoraka podvrgnutih DPPH metodi i upravljati parametrima procesa ovisno o željenim rezultatima pomoću jednadžba regresije za antioksidativnu aktivnost koja je prikazana ispod Tablice 6. Jednadžba regresije je matematički izraz koji opisuje odnos između nezavisnih i ovisnih varijabli u statističkom modelu regresije, a ilustrira kako se ponaša polinom izrađen na temelju obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima vremenu tretiranja, udjelu etanola i vremenu skladištenja. Rezultati optimizacije ukazuju da će se optimalna vrijednost AA koja iznosi $9,72806 \mu\text{mol Trolox/g}_{\text{s.tv.}}$ postići pri optimalnim parametrima (vrijeme tretiranja: 5,972 minuta, ekstrakcijsko otapalo: 14,915 %-tna otopina etanola te vrijeme skladištenja: $2,669 * 10^{-7}$ dana).

Tablica 7. Rezultati optimizacije toplinske ekstrakcije (analiza FRAP metodom)

Faktor	Niska vrijednost	Visoka vrijednost	Optimalna vrijednost
Vrijeme tretiranja	3,000	9,000	3,000
Udio etanola	0,000	50,000	23,4002
Vrijeme skladištenja	0,000	7,000	7,000

Jednadžba regresije: AA (FRAP) = 27,955 + 0,0406944* Vrijeme tretiranja + 0,4341*Udio etanol + 0,466587*Vrijeme skladištenja - 0,00898148* (Vrijeme tretiranja)² + 0,00668333*Vrijeme tretiranja*Udio etanol - 0,0321429* Vrijeme tretiranja*Vrijeme skladištenja - 0,00862533* (Udio etanol)² - 0,00720952*Udio etanol* Vrijeme skladištenja

Rezultati optimizacije kod uzoraka koji su podvrgnuti FRAP metodi ukazuju da će se optimalna vrijednost AA koja iznosi 35,3107 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ postići pri optimalnim parametrima (vrijeme tretiranja: 3 minute, ekstrakcijsko otapalo: 23,4002 %-tna otopina etanola te vrijeme skladištenja: 7 dana). Optimalna vrijednost koja je gore navedena dobivena je na način da su optimalni uvjeti uneseni u jednadžbu regresije koja se nalazi ispod Tablice 7.

Hidrodinamičke sile mogu nastati i zbog visokog tlaka koji je povezan sa kolapsom kavitacijskih mjehurića (Režek Jambrak, 2008). Kako se u ovom tipu uređaja pokušava izbjeći pojava kolapsa kavitacijskog mjehurića kojim se olakšava izdvajanje bioaktivnih komponenti očekivalo bi se da će antioksidativna vrijednost trebala biti niža od one koja je bila kod uzorka koji su tretirani ultrazvučnim uređajem sa sondom. Kod nas to nije slučaj jer su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene kod uzoraka koji su tretirani toplinskom kupelji više. Razlog tome može biti veća stabilnost i kontrola

tretmana u toplinskoj kupelji koji mogu smanjiti razgradnju osjetljivih antioksidativnih spojeva tijekom procesa, čime se povećava ukupna antioksidacijska aktivnost uzorka.

Ekstrakti dobiveni toplinskom ekstrakcijom pokazali su 58,99 % veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na one dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom prije skladištenja. To ukazuje na to da toplina povoljnije djeluje na oslobađanje antioksidativnih spojeva, dok ultrazvuk, iako učinkovit, nije toliko efikasan za ove specifične spojeve. Mogući razlozi uključuju termičku stabilizacija spojeva odgovornih za AA koji postaju stabilniji ili dostupniji na višim temperaturama jer toplina olakšava oslobađanje vezanih spojeva iz stanica (Bai i sur., 2021). Također, Shen i sur. (2023) su u svom radu naveli da korištenjem ultrazvuka visokog intenziteta se može postići manja učinkovitost iz razloga jer se korištenjem ultrazvuka visokog intenziteta stvaraju hidroksilni radikali, koji reagiraju s fenolnim spojevima i razgrađuju ih.

5. ZAKLJUČCI

1. Procijenjeni su optimalni parametri (amplituda: 81,23 %, vrijeme tretiranja: 9 minuta i udio etanola od 43,398 %) ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta za postizanje optimalnih AA vrijednosti mjerenih FRAP metodom, te optimalni parametri (amplituda 75,91 %, vrijeme tretiranja 8,98 minute i udio etanola 32,59 %) za mjerenja AA određena DPPH metodom.
2. Nakon skladištenja od 7 dana na temperaturi od +4 °C, najveći pad AA (određene DPPH metodom) izmjeren je kod uzorka podvrgnutog ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta TU 10 (amplituda:50 %; vrijeme tretiranja: 9 minuta i ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna otopina etanola) te iznosi 60,94 %.
3. Najveći pad AA (mjerene DPPH metodom) izmjeren je kod uzorka podvrgnutog toplinskoj ekstrakciji T0/3 (vrijeme tretiranja: 3 minute i ekstrakcijsko otapalo: deionizirana voda) te iznosi 60,2 %.
4. Procijenjeni su optimalni parametri (vrijeme tretiranja: 3 minute i udio etanola od 23,4 %) toplinske ekstrakcije za postizanje optimalnih AA vrijednosti mjerenih FRAP metodom, te optimalni parametri (vrijeme tretiranja 5,97 minute i udio etanola 14,915 %) za mjerenja AA određena DPPH metodom.
5. Statističkom analizom rezultata dobivenih nakon toplinske i ultrazvučne ekstrakcije, utvrđen je statistički značajan utjecaj kvadratne interakcije udjela etanola ($p < 0,05$) na izlaznu vrijednost antioksidacijske aktivnosti određenu FRAP i DPPH metodama.
6. Prije skladištenja ekstrakti dobiveni iz uzoraka na kojima je provedena toplinska ekstrakcija pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata dobivenih iz uzoraka tretiranih ultrazvukom i to u prosjeku za 58,99 %.

6. POPIS LITERATURE

1. Al-Dhabi NA, Ponmurugan K, Maran P (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrason Sonochem*, 34, 206–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
2. Al-Weshahy, A., El-Nokety, M., Bakhete, M., & Rao, V. (2013). Effect of storage on antioxidant activity of freeze-dried potato peels. *Food Research International*, 50(2), 507-512. Pristupljeno: 1.9.2024.
3. Apak, R. (2019). Current issues in antioxidant measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9187-9202. Pristupljeno: 7.7.2024.
4. Astráin-Redín, L., Ciudad-Hidalgo, S., Raso, J., Condón, S., Cebrián, G., Álvarez, I., & Astráin-Redín, L. (2019). Application of high-power ultrasound in the food industry. U *Sonochemical Reactions*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90444>. Pristupljeno: 3.5.2024.
5. Bai, Y. P., Zhou, H. M., Zhu, K. R., & Li, Q. (2021). Effect of thermal treatment on the physicochemical, ultrastructural and nutritional characteristics of whole grain highland barley. *Food Chemistry*, 346, 128657. Pristupljeno: 4.9.2024.
6. Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K., & Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293. Pristupljeno: 4.5.2024.
7. Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. Pristupljeno: 30.8.2024.
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30. Pristupljeno: 19.11.2023.
9. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901. Pristupljeno: 1.9.2024.
10. Chavan Prasad, P., Sharma, S., Sharma, S. R., Mittal, T. C., & Jaiswal, A. K. (2022). Application of high-intensity ultrasound to improve food processing efficiency: A review. *Foods*, 11(1), 122. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>. Pristupljeno: 3.5.2024.

11. Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 369-382. doi:10.1002/jsfa.1370. Pristupljeno: 2.3.2024.
12. Ekelund, L., & Jönsson, H. (2011). How does modernity taste? Tomatoes in the societal change from modernity to late modernity. *Culture Unbound*, 3(3), 439-454. Pristupljeno: 20.3.2024.
13. Elbadrawy, E., & Sello, A. (2011). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*. Pristupljeno: 21.11.2023.
14. Fernando, G. S. N., Wood, K., Papaioannou, E. H., Marshall, L. J., Sergeeva, N. N., & Boesch, C. (2021). Application of an ultrasound-assisted extraction method to recover betalains and polyphenols from red beetroot waste. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(26), 8736-8747. Pristupljeno: 8.7.2024.
15. Gavrilov, L. R. (2014). *Use of focused ultrasound for stimulation of various neural structures*. Nova Biomedical. Pristupljeno: 8.7.2024.
16. Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546. Pristupljeno: 8.7.2024.
17. Hu, Z. L., Deng, L., Yan, B., Pan, Y., Luo, M., Chen, X. Q., ... & Chen, G. P. (2011). Silencing of the LeSGR1 gene in tomato inhibits chlorophyll degradation and exhibits a stay-green phenotype. *Biologia Plantarum*, 55, 27-34. Pristupljeno: 31.8.2024.
18. Kumcuoglu, S., Yilmaz, T., & Tavman, S. (2013). Ultrasound assisted extraction of lycopene from tomato processing wastes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4102–4107. doi:10.1007/s13197-013-0926-x. Pristupljeno: 6.3.2024.
19. Khan, U. M., Sevindik, M., Zarrabi, A., Nami, M., Ozdemir, B., Kaplan, D. N., Selamoglu, Z., et al. (2021). Lycopene: Food sources, biological activities, and human health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2021/2713511>. Pristupljeno: 7.3.2024.
20. Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Ćustić, M., Poljak, M., & Romić, D. (2004). *Povrcarstvo*. Zrinski d.d., Čakovec. Pristupljeno: 20.3.2024.

21. Li, Z., Dong, J., Wang, L., Zhang, Y., Zhuang, T., Wang, H., Cui, X., & Wang, Z. (2021). A power-triggered preparation strategy of nano-structured inorganics: Sonosynthesis. *Nanoscale Advances*, 3, 2423-2447. Pristupljeno: 3.5.2024.
22. Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330. Pristupljeno: 20.3.2024.
23. Mason, T. J., Paniwnyk, L., Chemat, F., & Vian, M. A. (2011). Ultrasonic food processing. U *Alternatives to Conventional Food Processing*, 387-414. Pristupljeno: 8.7.2024.
24. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. Pristupljeno: 8.7.2024.
25. Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44(5), 1528-1535. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.005>. Pristupljeno: 20.3.2024.
26. Park, M.-H., Sangwanankul, P., & Baek, D.-R. (2018). Changes in carotenoid and chlorophyll content of black tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) during storage at various temperatures. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.002>. Pristupljeno: 20.3.2024.
27. Periago Jesús, M., García-Alonso, J., Jacob, K., Belén Olivares, A., José Bernal, M., Dolores Iniesta, M., ... & Ros, G. (2009). Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) during vine ripening. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(8), 694-708. Pristupljeno: 20.3.2024.
28. Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144-156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>. Pristupljeno: 3.5.2024.
29. Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2013). Ultrasound-assisted extraction. U *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, 89-112. The Royal Society of Chemistry. Pristupljeno: 21.11.2023.

30. Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Miesbauer, O., & Eisner, P. (2021). Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules*, 26(5), 1244. Pristupljeno: 31.8.2024.
31. Raffo, A., La Malfa, G., Fogliano, V., Maiani, G., & Quaglia, G. (2006). Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 11-19. Pristupljeno: 20.3.2024.
32. Režek Jambrak, A. (2008). *Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke* (Disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:327662>. Pristupljeno: 21.4.2024.
33. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods*, 5(21), 5990-5999. Pristupljeno: 5.9.2024.
34. Santos-Sánchez, N. F., et al. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, 10, 1-29. Pristupljeno: 8.7.2024.
35. Seo, J. B., Shin, G. H., Jang, M. H., Lee, Y. S., Jung, H. J., Yoon, B. K., & Choi, K. J. (2013). Breeding of black tomato 'Hei' for protected cultivation. *Horticultural Science & Technology*, 31(6), 833-836. Pristupljeno: 20.3.2024.
36. Sharmila, G., Nikitha, V. S., Ilaiyarasi, S., Dhivya, K., Rajasekar, V., Kumar, N. M., ... & Muthukumar, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84, 13-21. Pristupljeno: 1.9.2024.
37. Sharmin, T., Ahmed, N., Hossain, A., Hosain, M. M., Mondal, S. C., Haque, R., Siddik, A., et al. (2016). Extraction of bioactive compound from some fruits and vegetables (pomegranate peel, carrot and tomato). Pristupljeno: 6.3.2024.
38. Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y. i sur. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 106646. Pristupljeno: 4.9.2024.

39. Stanić, Z., & Senjković, R. (1994). Ekstrakcija sa superkričkim ugljik-dioksidom. *Farmaceutski glasnik*, 50(5), 123-128. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:913464>. Pristupljeno: 6.3.2024.
40. Suslick, K. S., Eddingsaas, N. C., Flannigan, D. J., Hopkins, S. D., & Xu, H. (2018). The chemical history of a bubble. *Accounts of Chemical Research*, 51, 2169-2178. Pristupljeno: 2.5.2024.
41. Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). *Applied Sonochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. Pristupljeno: 8.12.2023.
42. Toor, R. K., & Savage, G. P. (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*, 38(5), 487-494. Pristupljeno: 6.3.2024.
43. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313. Pristupljeno: 2.5.2024.
44. Wells, P. N. (2020). Physics of ultrasound. In *Ultrasonic Exposimetry* (pp. 9-45). CRC Press. Pristupljeno: 8.7.2024.
45. Yusoff, I. M., Taher, Z. M., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157, 111268. Pristupljeno: 4.5.2024.

7. POPIS SLIKA

Slika 1. Q700CA Sonicator – Cannasol Technologies. [Q700CA Sonicator - Cannasol Technologies](#). Pristupljeno: 20.2.2024.

Slika 2. Medical ultrasonic bath SONOREX DIGITEC. medicalEXPO. [Medical ultrasonic bath – SONOREX DIGITEC – BANDELIN electronic – laboratory / compact \(medicalexpo.com\)](#). [Medical ultrasonic bath - SONOREX DIGITEC - BANDELIN electronic - laboratory / compact \(medicalexpo.com\)](#). Pristupljeno: 20.2.2024.

Slika 3. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28,25-30; Pristupljeno: 20.2.2024.

8. PRILOZI

Prilog 1.

Tablica analize varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu u uzorku suhe kore rajčice DPPH metodom koji su tretirani ultrazvukom (A-amplituda, B- vrijeme tretiranja, C- udio etanola, D-vrijeme skladištenja, AA-kvadratna interakcija amplitude, AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC- interakcija amplitude i udjela etanola, AD- interakcija amplitude i vremena skladištenja BB- kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, BD- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, CC- kvadratna interakcija udjela etanola, CD- interakcija udjela etanola i vremena skladištenja)

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F- omjer</i>	<i>P- vrijednost</i>
A	10,53	1	10,53	4,06	0,0508
B	26,2315	1	26,2315	10,1	0,0029
C	0,87111	1	0,87111	0,34	0,5657
D	3,81338	1	3,81338	1,47	0,2327
AA	9,077	1	9,077	3,5	0,0688
AB	3,15375	1	3,15375	1,21	0,277
AC	0,4704	1	0,4704	0,18	0,6726
AD	0,748225	1	0,748225	0,29	0,5944
BB	3,58249	1	3,58249	1,38	0,2471
BC	13,0685	1	13,0685	5,03	0,0305
BD	1,28822	1	1,28822	0,5	0,4853
CC	52,864	1	52,864	20,36	0,0001
CD	5,36694	1	5,36694	2,07	0,1583
Ukupna pogreška	103,854	40	2,59634		
Ukupno (korelacija)	234,919	53			

Prilog 2.

Tablica analize varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu u uzorku suhe kore rajčice FRAP metodom koji su tretirani ultrazvukom (A-amplituda, B- vrijeme tretiranja, C-udio etanola, D-vrijeme skladištenja, AA-kvadratna interakcija amplitude, AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC- interakcija amplitude i udjela etanola, AD- interakcija amplitude i vremena skladištenja BB- kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, BD- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, CC- kvadratna interakcija udjela etanola, CD- interakcija udjela etanola i vremena skladištenja)

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A	174,548	1	174,548	10,53	0,0024
B	424,223	1	424,223	25,6	0
C	874,779	1	874,779	52,79	0
D	0,0748	1	0,0748	0	0,9468
AA	38,844	1	38,844	2,34	0,1336
AB	89,668	1	89,668	5,41	0,0252
AC	5,5392	1	5,5392	0,33	0,5664
AD	4,08714	1	4,08714	0,25	0,6222
BB	40,8483	1	40,8483	2,47	0,1243
BC	142,789	1	142,789	8,62	0,0055
BD	2,39218	1	2,39218	0,14	0,706
CC	361,242	1	361,242	21,8	0
CD	16,7828	1	16,7828	1,01	0,3203
Ukupna pogreška	662,792	40	16,5698		
Ukupno (korelacija)	2838,61	53			

Prilog 3.

Tablica analize varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu u uzorku suhe kore rajčice DPPH metodom koji su tretirani toplinskom ekstrakcijom (A-vrijeme tretiranja, B- udio etanola, C-vrijeme skladištenja, AA- kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, AC- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, BB- kvadratna interakcija udjela etanola, BC-interakcija udjela etanola i vremena skladištenja)

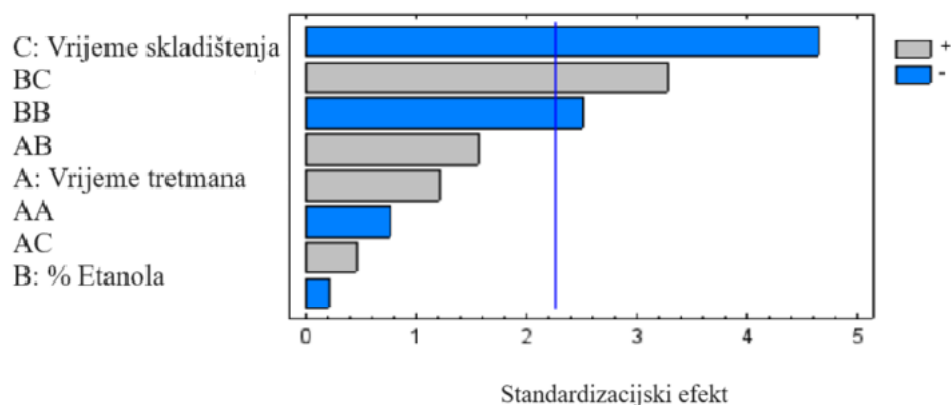
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F- omjer</i>	<i>P- vrijednost</i>
A	1,29363	1	1,29363	1,44	0,26
B	0,0363	1	0,0363	0,04	0,8449
C	19,282	1	19,282	21,53	0,0012
AA	0,494678	1	0,494678	0,55	0,4763
AB	2,14245	1	2,14245	2,39	0,1563
AC	0,1875	1	0,1875	0,21	0,6581
BB	5,58534	1	5,58534	6,24	0,034
BC	9,57653	1	9,57653	10,7	0,0097
Ukupna pogreška	9,57653	9	0,895401		
Ukupno (korelacija)	46,6571	17			

Prilog 4.

Tablica analize varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu u uzorku suhe kore rajčice FRAP metodom koji su tretirani toplinskom ekstrakcijom (A-vrijeme tretiranja, B- udio etanola, C-vrijeme skladištenja, AA- kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB- interakcija vremena tretiranja i udjela etanola, AC- interakcija vremena tretiranja i vremena skladištenja, BB- kvadratna interakcija udjela etanola, BC-interakcija udjela etanola i vremena skladištenja)

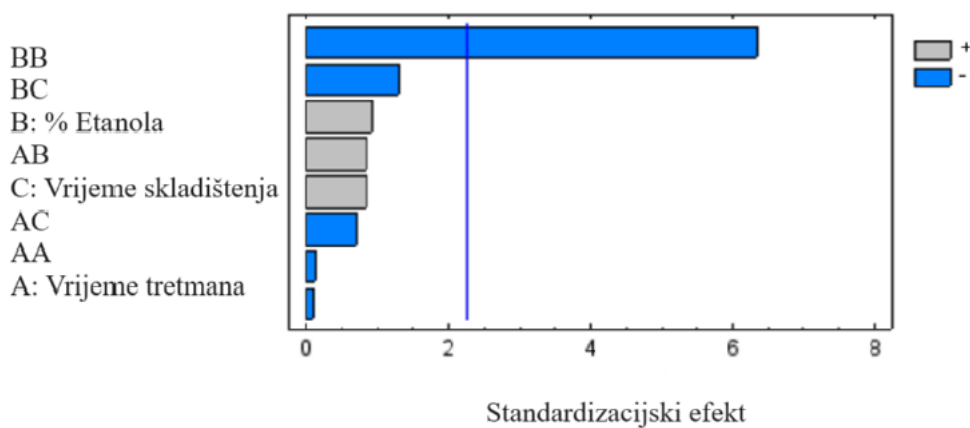
<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A	0,016875	1	0,016875	0,01	0,9409
B	2,34968	1	2,34968	0,81	0,3918
C	1,92734	1	1,92734	0,66	0,4363
AA	0,026136	1	0,026136	0,01	0,9265
AB	2,01001	1	2,01001	0,69	0,4269
AC	1,36687	1	1,36687	0,47	0,5099
BB	116,244	1	116,244	40,03	0,0001
BC	4,77541	1	4,77541	1,64	0,2317
Ukupna pogreška	26,1338	9	2,90376		
Ukupno (korelacija)	154,85	17			

Prilog 5.



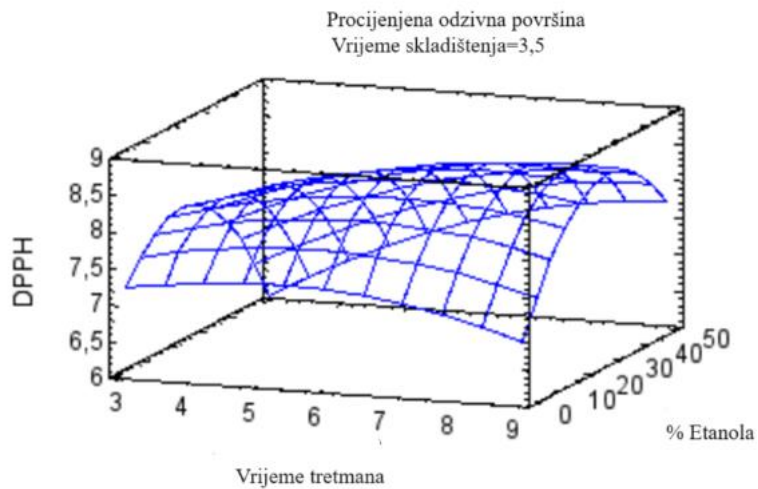
Slika 6. Pareto dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom na uzorcima koji izloženi toplinskoj ekstrakciji

Prilog 6.



Slika 7. Pareto dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom na uzorcima koji izloženi toplinskoj ekstrakciji

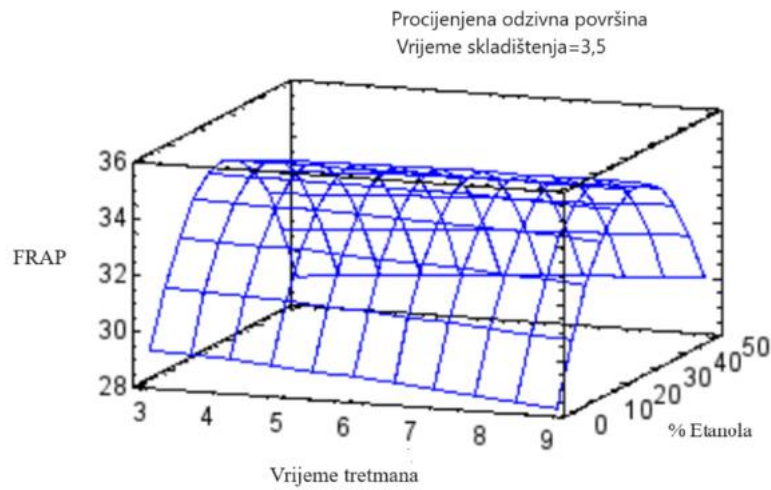
Prilog 7.



Slika 8. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute DPPH metodi na kojima je provedena toplinska ekstrakcija

Na 3D dijagramu odzivne površine prikazane na slici 8. vidljivo je da vrijednost AA naglo raste što se tiče udjela etanola do razine od 14 % etanola nakon čega započinje blagi pad AA. Gledajući izgled odzivne površine s obzirom na vrijeme tretiranja vidljivo je da se vrijednost AA povećava s porastom vremena tretiranja do 6 minute nakon čega se vrijednosti smanjuju. Ova odzivna površina odgovara vremenu skladištenja od tri i pol dana.

Prilog 8.

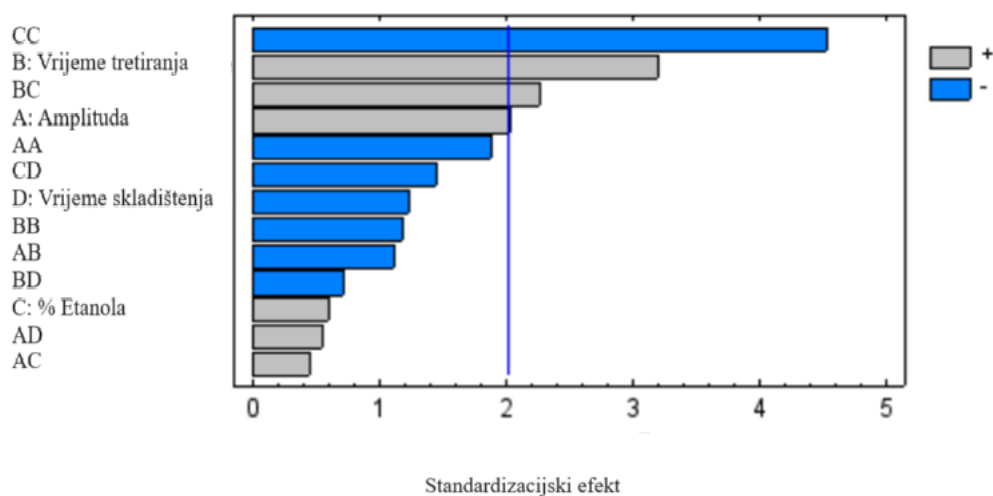


Slika 9. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute FRAP metodi na kojima je provedena toplinska ekstrakcija

Na dijagramu odzivne površine za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom, koji je prikazan slikom 9. vidljivo je da vrijednost AA pada što je vrijeme tretiranja duže te se najviša vrijednost postiže kod vremenskog tretiranja od 3 minute. Što se tiče udjela etanola AA raste do trenutka kada je udio etanola korištenog u eksperimentu nešto viši od 20 % nakon čega opet počinje opadati. Ova odzivna površina odgovara vremenu skladištenja od tri i pol dana.

Prilog 9.

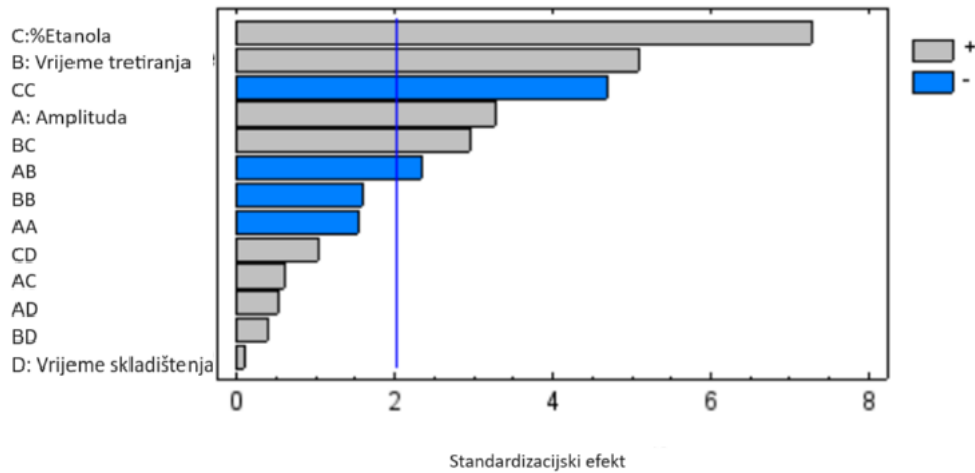
Paretovi dijagrami su vizualan način prikazivanja statističke značajnosti zadanih vrijednosti. Plava linija jasno razgraničava statistički značajne vrijednosti od onih koje nisu statistički značajne. Sve što se nalazi desno od ove linije smatra se statistički značajnim, dok su sve vrijednosti koje se nalaze lijevo od linije definirane kao statistički neznačajne.



Slika 10. Paretovi dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom

Iz slike 10. to jest tog Paretovog dijagrama vidljivo je da samo 3 učinka imaju statističku značajnost na razini pouzdanosti od 95 % na uzorcima na kojima je provedena DPPH metoda jer se nalaze i na lijevoj strani od linije koja definira statističku značajnost.

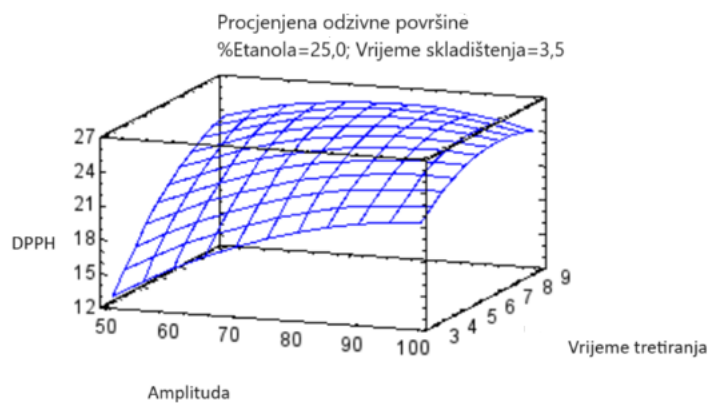
Prilog 10.



Slika 11. Pareto dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom

Iz slike 11. to jest Paretoovog dijagrama za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom vidljivo je da ima šest vodoravnih linija koje se nalaze i lijevo od okomite linije koja razdvaja statistički značajne od neznačajnih učinaka. Ovo ukazuje na šest učinaka koji imaju statističku značajnost što se poklapa i sa tabličnim vrijednostima koji su navedeni tablici 5.

Prilog 11.

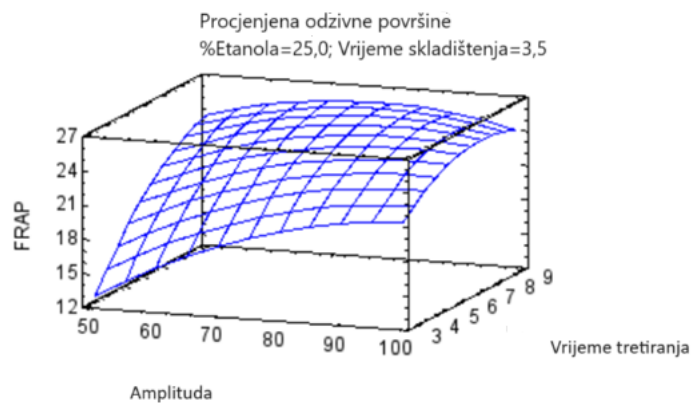


Slika 12. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute DPPH metodi

Dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute DPPH metodi (slika 12) prikazuje utjecaj zadanih parametara, odnosno amplitude i vremena

tretiranja na antioksidativnu aktivnost sa napomenom da su druga dva uvjeta bila konstantna odnosno korištena je 25 % etanol i vrijeme skladištenja je tri i pol dana. Iz dijagrama vidljivo je da bi se najviša AA postigla kod amplitude od 80 do 90 i vremena tretiranja od 7 minuta.

Prilog 12.



Slika 13. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute FRAP metodi

Kod drugog 3D dijagrama koji prikazuje odzivnu površinu za antioksidativnu aktivnost za uzorke podvrgnute FRAP metodi (slika 13.) vidljiv je nešto drugačiji oblik odzivne površine koji ukazuje da su pri drugim uvjetima amplitude i vremena skladištenja postignuti maksimalne vrijednosti AA. Također vidljivo je i iz pozicioniranja same odzivne površine i brojčanih vrijednosti na skali od FRAP da su puno veće brojčane vrijednosti AA postignute kod uzoraka koji su podvrgnuti ovoj metodi nego kod uzoraka koji su podvrgnuti DPPH metodi.

Izjava o izvornosti

Ja _____ Filip Klemen _____ 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