

# Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost kore banane

---

Pavić, Rina

Master's thesis / Diplomski 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:159:333030>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Rina Pavić

**UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE  
POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA NA  
SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA I  
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST KORE  
BANANE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivone Elez Garofulić te uz pomoć dr. sc. Erike Dobrosravić.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić, na ukazanom povjerenju i pružanju prilike za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća, kao i na svim danim savjetima za pisanje rada. Zahvaljujem i dr. sc. Eriki Dobroslavić na pomoći oko eksperimentalnog dijela te izdvojenom vremenu za korekciju rada.*

*Ipak, najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima, Anti i Sanji, bratu Toniju, najboljoj prijateljici Mariji i dečku Marku koji su mi pružali beskrajnu podršku tijekom pisanja diplomskog rada i bili uz mene na ovom zanimljivom putu ka stjecanju akademskog zvanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

### UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNE MIKROVALOVIMA NA SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST KORE BANANE

Rina Pavić, univ. bacc. nutr.  
0058215061

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je odrediti optimalne parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA) i flavonoida (TF) iz kore banane te odrediti antioksidacijsku aktivnost (AOA) tih ekstrakata. Kao otapalo korištena je 30 %-tna vodena otopina etanola u različitim omjerima (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), a varirani su i temperatura (40, 60 i 80 °C) i vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Prosječna vrijednost THA bila je 109,52 mg CGA/100 g, TF 35,63 mg QCT/100 g, AOA 6,55 mmol/100 g kod FRAP metode, a 5,98 mmol/100 g kod ABTS metode. Utvrđena optimalna temperatura za maksimalne prinose THA i TF je 40 °C, uz ekstrakcijsko vrijeme 5 minuta te omjer uzorka i otapala 1:50 g/mL. Optimalna temperatura za maksimalnu AOA mjerenu FRAP metodom je 60 °C, a za ABTS 80 °C, uz omjer uzorka i otapala 1:50 g/mL i ekstrakcijsko vrijeme 5 minuta za FRAP i ABTS.

**Ključne riječi:** kora banane, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, hidroksicimetne kiseline, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 46 stranica, 7 slika, 8 tablica, 46 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Maja Repajić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 24. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

Rina Pavić, univ. bacc. nutr.  
0058215061

**Abstract:** The aim of this study was to determine the optimal parameters for microwave-assisted extraction (MAE) to isolate total hydroxycinnamic acids (THA) and flavonoids (TF) from banana peel and assess the antioxidant activity (AOA) of these extracts. A 30% aqueous ethanol solution was used as the solvent in various ratios (1:40, 1:50 and 1:60 g/mL), with variations in temperature (40, 60, and 80 °C) and extraction time (5, 10, and 15 min). The average THA content was 109.52 mg CGA/100 g, TF was 35.63 mg QCT/100 g, and AOA was 6.55 mmol/100 g (FRAP method) and 5.98 mmol/100 g (ABTS method). The optimal conditions for maximum THA and TF yield were 40 °C, 5 min and a 1:50 g/mL solvent ratio. For AOA, the optimal conditions were: 60 °C with a 1:40 g/mL ratio (FRAP), and 80 °C with a 1:50 ratio (ABTS), with 5 min extraction time (FRAP and ABTS).

**Keywords:** banana peel, microwave-assisted extraction, hydroxycinnamic acids, flavonoids, antioxidant activity

**Thesis contains:** 46 pages, 7 figures, 8 tables, 46 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor

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

**Reviewers:**

1. Maja Repajić, PhD, Associate professor (president)
2. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (member)
4. Sandra Albino, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 24<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEOIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. BOTANIČKA OBILJEŽJA BANANE</b> .....	2
<b>2.2. NUSPROIZVODI PRERADE BANANE</b> .....	3
2.2.1.    Upotreba stabljike i lišća banane kao nusproizvoda prerade banane .....	3
2.2.2.    Sastav kore banane .....	4
2.2.3.    Bioaktivni spojevi u kori banane .....	5
2.2.4.    Upotreba kore banane kao nusproizvoda prerade.....	9
<b>2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA</b> .....	10
2.3.1.    Konvencionalne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva.....	11
2.3.2.    Napredne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva .....	11
<b>2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI</b> .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
<b>3.1. MATERIJALI I LABORATORIJSKA OPREMA</b> .....	16
3.1.1.    Uzorak kore banane .....	16
3.1.2.    Kemikalije i standardi .....	16
3.1.3.    Laboratorijsko posuđe.....	18
3.1.4.    Laboratorijski uređaji .....	19
<b>3.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA</b> .....	19
<b>3.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA</b> .....	21
<b>3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA</b> .....	22
<b>3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM</b> .....	23
<b>3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ABTS METODOM</b> .....	25
<b>3.7. OBRADA REZULTATA</b> .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	28
<b>4.1. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA MASENI UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOIDA EKSTRAKTIMA KORE BANANE</b> .....	28
4.1.1.    Utjecaj parametara ekstrakcije na prinos ukupnih hidrokscimetnih kiselina	29
4.1.2.    Utjecaj parametara ekstrakcije na prinos ukupnih flavonoida .....	31
<b>4.2. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST EKSTRAKATA KORE BANANE</b> .....	34
4.2.1.    Utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom	35
4.2.2.    Utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom	37
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41



## 1.UVOD

Banana (*Musa* sp.) je tropsko voće slatkog okusa porijeklom iz jugoistočne Azije. Smatra se da se počela uzgajati tisućama godina prije nove ere, a tadašnjim je narodima, osim za prehranu, služila u medicinske svrhe. Sladak okus i dostupnost tijekom cijele godine čine je voćem za masovnu konzumaciju. Stoga, ne iznenađuje podatak da se na globalnoj razini godišnje uzgoji oko 20 milijuna tona banana. Danas je zastupljeno više od 1000 vrsta, pri čemu se iz zemalja Središnje i Južne Amerike te Filipina izvozi više od 90 % ukupno uzgojenih plodova. Najveći uvoznici su zemlje Europske unije, Sjedinjene Američke Države, Kina, Rusija i Japan.

Masovna proizvodnja i konzumacija imaju za posljedicu stvaranje velikih količina biootpada od nusproizvoda banane. Obzirom da je globalni cilj i odgovornost svih ljudi smanjivanje količine otpada od hrane, postavlja se pitanje kako efikasno iskoristiti nusproizvode prerade, posebno lišće, stabljiku i koru banane. Kora banane čini čak trećinu ploda te se odbacuje, iako ima vrlo bogat sastav. Izvor je brojnih bioaktivnih spojeva, među kojima se ističu fenolni spojevi. Fenolni spojevi obuhvaćaju široku skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji služe zaštiti biljke od štetnih vanjskih čimbenika. U ljudskom organizmu fenoli mogu djelovati kao antioksidansi, odnosno, mogu prevenirati oštećenja stanica ili obnoviti stanice oštećene oksidativnim stresom koji je posljedica prisutnosti slobodnih radikala. Također, fenoli mogu pomoći u snižavanju krvnog tlaka i šećera u krvi te doprinijeti boljoj funkciji živčanih stanica pa kao takvi imaju ulogu u prevenciji kroničnih nezaraznih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma i neurodegenerativnih bolesti. Stoga se mogu koristiti u dodacima prehrani ili funkcionalnim prehrambenim proizvodima, prije čega ih je potrebno ekstrahirati odgovarajućom tehnikom. Jedna od tehnika koja se koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-Assisted Extraction* MAE). MAE spada u napredne tehnike za ekstrakciju, jer može povećati prinose i smanjiti rizik od degradacije od osjetljivih spojeva u kraćem vremenu, pri čemu troši manje otapala nego što se troši u konvencionalnim tehnikama.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj uvjeta MAE na izolaciju fenolnih spojeva te posljedično na antioksidacijsku aktivnost u ekstraktu kore banane, uz 30 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo. Određene su ukupne hidroksicimetne kiseline (eng. *total hydroxycinnamic acids*, THA) i ukupni flavonoidi (eng. *total flavonoids*, TF) te antioksidacijska aktivnost ekstrakta kore banane pomoću FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i ABTS (eng. *2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid*) metoda.

## 2. TEOIJSKI DIO

### 2.1. BOTANIČKA OBILJEŽJA BANANE

Banana je zeljasta biljka koja pripada rodu *Musa* i obitelji *Musaceae*. Raste u vlažnim tropskim područjima, u temperaturnom rasponu od 15 do 38 °C. Iako biljka nalikuje stablu (slika 1) te može doseći visinu 2 – 9 m, definira se kao drvenasta biljka, jer pripada jednosupnicama (DHAC, 2023). Plodovi formiraju grozdove, a u svakom grozdu je oko 20 plodova. Za dozrijevanje plodova potreban je period od godine dana, a branje se odvija u jesen dok su banane još zelene. Globalno se najčešće uzgajaju 3 vrste banana: *Musa sapientum*, *Musa paradisiaca* i *Musa cavendishii* (Ansari i sur., 2023).



**Slika 1.** Stablo banane (Tree Plantation, 2024)

Biljku banane čini adventivno korijenje, nadzemno „deblo“, lišće te stabljika koja nosi cvijet, odnosno voćni plod. Nadzemno „deblo“ naziva se pseudostabljika te se sastoji od koncentričnih slojeva lisnih omotača, koji formiraju cilindar promjera 20 – 50 cm. Boja pseudostabljike varira među kultivarima od zelene s crnim mrljama do žutozelene sa smeđim mrljama. Pravom se stabljikom naziva veliki podzemni izdanak, a meristem ili tvorno tkivo vršnog pupoljka na početku daje lišće prije nego što se izduži kroz pseudostabljiku i formira cvat 10 – 15 mjeseci nakon sadnje. Svaka pseudostabljika ima samo jedan cvat. Listovi banane izbijaju čvrsto smotani iz središta pseudostabljike, u spiralnom obliku, a ovojnice lišća sužavaju se s obje strane te formiraju peteljku koja nosi cvat. Zanimljivo je da se veličina listova mijenja kroz

periode sazrijevanja biljke, a kada dosegne maksimalnu veličinu, list banane najveći je list na svijetu. Biljka banane uglavnom posjeduje 11 listova. Nezreli cvat obavijen je ljubičastim pupoljkom unutar kojeg se nalaze muški i ženski cvjetovi, a ponekad su između njih hermafroditni cvjetovi. Plod se razvija iz ženskih cvjetova, a muški cvjetovi obično otpadnu. Kora koja obavija plod potječe od cvjetnog spremnika i vanjskog sloja perikarpa (egzokarpa), dok mesnata pulpa, odnosno jestivi voćni dio, potječe iz najdubljeg sloja perikarpa (endokarpa) (DHAC, 2023).

Fenotipske karakteristike poput promjera i visine pseudostabljike usko su povezane s rastom i prinosom biljke. Poželjno je da tlo na kojem se uzgaja banana bude dobro drenirano, ali treba moći i dobro zadržavati vodu. Tlo bi trebalo imati pH vrijednost od 5,5 do 6,5. Iako biljka preferira sunčane dane i temperature oko 27 °C, potrebne su joj redovite i obilate padaline s adekvatnom godišnjom raspodjelom. Ako se uzgajaju u područjima koja nemaju redovite padaline, potrebno je navodnjavanje tla. Optimalna temperatura za sazrijevanje plodova je između 21 i 22 °C, uz relativnu vlažnost zraka od 90 % (Ansari i sur., 2023).

Sazrijevanjem plodova povećava se sadržaj šećera i etilena, a smanjuje sadržaj škroba. Prosječna masa ploda banane iznosi 125 grama, a gotovo 75 % čini voda. Plod banane izvor je vitamina B6, vitamina C, vlakana, kalija i magnezija, a nepotpuno dozreli plodovi izvor su rezistentnog škroba, koji djeluje kao prebiotik u debelom crijevu (Hikal i sur., 2022).

## **2.2. NUSPROIZVODI PRERADE BANANE**

U nusproizvode prerade banane ubrajaju lišće, pseudostabljika, kora, peteljka i cvjetovi. Zasada, najveći potencijal za korištenje u industriji imaju stabljika, pseudostabljika, lišće i kora banane.

### **2.2.1. Upotreba stabljike i lišća banane kao nusproizvoda prerade banane**

Utvrđeno je da stabljika i lišće banane predstavljaju izvor karotena, nikotinske kiseline, riboflavina i tiamina. Stabljika i lišće mogu se iskoristiti kao gnojivo zbog velikih količina lako razgradivih, topljivih organskih materijala koji predstavljaju kvalitetan materijal za aerobno kompostiranje te zastupljenosti minerala poput dušika, fosfora i kalija (Zou i sur., 2022). Lišće banane koristi se za zamatanje hrane koja se kuha, za izradu odjeće i kao sredstvo za čišćenje podova. Također, obzirom da lišće banane ima učinak hlađenja, tradicionalno se koristilo za liječenje površinskih rana i opekotina od sunca (Heba, 2021).

Gregory i sur. (2015) koristili su svježe odsječeno pa osušeno lišće banane kao hranu za ovce koje su inficirali parazitima te su utvrdili da su tanini iz lišća inhibirali rast jajašaca određene vrste nematoda, što ukazuje na mogućnost upotrebe lišća banane kao antiparazitika u

budućnosti. Također, lišće banane ima kvalitetan nutritivni profil prema sadržaju proteina i vlakana, kao i klasična hrana za životinje pa se može koristiti kao alternativni izbor za prehranu životinja. Valja istaknuti kako se u lišću banane nalaze i fruktooligosaharidi, koji djeluju kao prebiotici pa potiču zdravlje crijevne mikrobiote životinja (Zou i sur., 2022).

Stabljika i lišće banane pokazali su potencijal kao supstrati za proizvodnju biogoriva pomoću anaerobnih bakterija *Clostridium thermophilus* i *Clostridium thermosaccharolyticus*, a pseudostabljika banane može se iskoristiti za proizvodnju oko 17 g/L etanola.

Vlakna u stabljici i lišću banane otvaraju mogućnost upotrebe nusproizvoda u proizvodnji tekstila, ubrusa i papira u većoj mjeri. Većinu sastava čine celuloza, hemiceluloza i lignin, koji su lako razgradivi te imaju dobra kemijska i mehanička svojstva. Ova vlakna otporna su na lužnati medij, dobro upijaju vodu i ekološki su prihvatljiva.

### 2.2.2. Sastav kore banane

Masa kore banane čini više od trećine ukupne mase banane pa uvelike doprinosi stvaranju otpada od hrane. Međutim, bogat sastav kore omogućuje široku upotrebu u raznim industrijama, najčešće u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Također, koristi se u poljoprivredi, tretiranju otpadnih voda, mikrobiologiji i zdravstvenoj zaštiti.

Sastav kore banane varira ovisno o vrsti biljke i fazi zrelosti, uvjetima uzgoja i uvjetima u okolišu te načinu prerade kore. Ipak, kao najvažnije sastavnice ističu se proteini, esencijalne masne kiseline, mineralne tvari, dijetalna vlakna i polifenoli zbog značaja za ljudsko zdravlje (Zou i sur., 2022).

Dosadašnjim je istraživanjima otkriven proteinski profil banane, profil aminokiselina, sekundarne strukturalne karakteristike te antioksidativna i antifungalna aktivnost proteina banane nakon ekstrakcije kiselinama. Takva otkrića potvrđuju potencijal upotrebe kore banane za poboljšanje nutritivnog profila hrane i hrane za životinje. Poznato je da se u kori banane nalazi i aminokiselina triptofan iz koje se sintetizira neurotransmiter dopamin. Obzirom da se smanjeno lučenje dopamina povezuje s neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove bolesti te depresijom, kora banane kao nusproizvod svakako privlači pažnju farmaceutske industrije. Od ostalih aminokiselina, utvrđene su valin, fenilalanin, leucin i treonin (Hikal i sur., 2022; Zou i sur., 2022)

Esencijalne masne kiseline svrstavaju se u funkcionalne prehrambene sastojke zbog uloge u izgradnji staničnih struktura i drugih bioaktivnih komponenata u stanicama. Kora banane sadrži višestruko nezasićene masne kiseline, među kojima se ističu linolenska i linolna masna kiselina. Obzirom da se moraju unijeti hranom ili dodacima prehrani jer se ne mogu sintetizirati u organizmu, kora se može razmotriti kao alternativni izvor za ekstrakciju esencijalnih masnih

kiselina. Esencijalnim masnim kiselinama pripisuje se protuupalno djelovanje i antitrombotski učinak te doprinos smanjenju rizika od pojave ateroskleroze, dijabetesa, osteoporoze, kardiovaskularnih bolesti te karcinoma (Zou i sur., 2022).

Kora banane obiluje mineralnim tvarima, a ističu se kalcij, fosfor, kalij i magnezij. Poznato je da spomenute mineralne tvari imaju brojne značajne uloge u organizmu, a posebno je zanimljiva uloga u prevenciji pojave neurodegenerativnih bolesti. Također, zanimljivo je da se količina svih spomenutih mineralnih tvari povećala tijekom procesa dozrijevanja banane u istraživanju Hikala i sur. (2022). Od ostalih mineralnih elemenata pronađeni su cink, natrij, mangan, bakar i željezo, ali u vrlo niskim koncentracijama.

Uloga dijetalnih vlakana u prevenciji pojave pretilosti, kardiovaskularnih bolesti te bolesti probavnog sustava potvrđena je brojnim istraživanjima. Kora banane dobar je izvor topljivih i netopljivih vlakana, a utvrđeno je kako se količina ukupnih i netopljivih vlakana povećava s dozrijevanjem banane (Zou i sur., 2022). U osušenoj kori banane nalazi se čak 50 % vlakana pa se ovaj nusprodukt često koristi kod pojave konstipacije te liječenja ulceroznog kolitisa i dijabetesa (Sidhu i Zafar, 2018).

### 2.2.3. Bioaktivni spojevi u kori banane

Drevni narodi Mezopotamije poznavali su i koristili stotinjak biljnih pripravaka u medicinske svrhe. Osim njih, valja spomenuti još Kineze i Ayurvede koji su koristili brojne biljne vrste za liječenje bolesti, ali i prehranu (Shi i sur., 2022). Kako pretjerana konzumacija hrane animalnog porijekla predstavlja veliki problem današnjice, svakim danom se sve više podiže svijest o potrebi za učestalijom konzumacijom hrane biljnog porijekla. Drugim riječima, potiče se prehrana bazirana na hrani biljnog porijekla ili *plant-based* prehrana zbog brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Pozitivni učinci na zdravlje proizlaze iz prisustva biljnih vlakana, omega-3 i omega-9 masnih kiselina, biljnih proteina i fitokemikalija, među kojima se ističu fenolni spojevi. Sadržaj fenolnih spojeva smatra se odlučujućim faktorom kod određivanja zdravstvene koristi biljne hrane jer količina fenolnih spojeva pozitivno korelira s antioksidacijskom aktivnošću te hrane. Redoviti unos antioksidanasa doprinosi zaštiti organizma od oksidativnog stresa, boljoj kontroli razine šećera u krvi, kontroli krvnog tlaka i poboljšanju lipidnog profila (Shi i sur., 2022).

Dosadašnjim je istraživanjima utvrđena prisutnost brojnih bioaktivnih spojeva u kori banane koji ispoljavaju zdravstvene benefite kod ljudi, pri čemu se ističu fenolni spojevi. Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti identificirani u raznim biljnim vrstama. Sudjeluju u obrani biljke od štetnih vanjskih utjecaja i ultraljubičastog zračenja. Imaju ulogu u rastu, zrenju i dozrijevanju biljke te formiranju arome, okusa i boje plodova. Polifenoli se dijele u 4 veće skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Pratyusha, 2022). Do sada je

identificirano više od 40 vrsta fenolnih spojeva u korama banane različitih kultivara, a svi identificirani spojevi mogu se podijeliti u 2 veće skupine: fenolne kiseline i flavonoide. Udio ukupnih fenolnih spojeva u kori banane varira od 4,95 do 47 mg ekvivalenta galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents*, GAE) / g suhe tvari (s.tv.), što su 1,5 – 3 puta veći udjeli nego u mesu banane (Vu i sur., 2018). Vu i sur. (2019) izvijestili su kako je antioksidativni potencijal kore banane veći od antioksidativnog potencijala kore ananasa, dinje, lubenice ili avokada. Babbar i sur. (2014) detektirali jednostavne i složene flavonoide, fenolne kiseline te antocijane u kori banane. Također, valja napomenuti kako su antioksidansi iz kore banane pokazali veći potencijal u hvatanju slobodnih radikala od antioksidansa prisutnih u kori citrusa (Ansari i sur., 2023)

Fenolne kiseline zastupljene su u sjemenkama, kori i lišću biljaka. Dije se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline često su povezane s ligninom, polimerom koji čvrsto povezuje celulozna vlakna i doprinosi mehaničkoj potpori biljke i otpornosti na razne oblike stresa. Hidroksicimetne kiseline prisutne su kao esteri s kvininskom kiselinom i glukozom (Shi i sur., 2022). Posljednjih godina, hidroksicimetne kiseline proučavaju se kao komponente u terapiji kožnih poremećaja i bolesti. Naime, utvrđeno je da hidroksicimetne kiseline mogu pomoći u zacjeljivanju rana, smanjenju opekline od sunca i prevenciji dijabetičkih čireva. Također, smatra se da bi u budućnosti mogle biti korisni agensi u terapiji psorijaze i dermatitisa, jer mogu djelovati na lučenje proupalnih citokina u organizmu (Contardi i sur., 2021). Od hidroksicimetnih kiselina i njezinih derivata, dosada su potvrđeni slijedeći spojevi: ferulinska kiselina i njezini derivati, metilester *p*-kumarinske kiseline, sinapinsku kiselinu i glikozid sinapinske kiseline te glikozid kafeinske kiseline. Srednja vrijednost ferulinske kiseline u kori banane, uz prosječno odstupanje, iznosila je  $11,9 \pm 1,2$   $\mu\text{g/g}$  s.tv., dok su njezini derivati bili zastupljeni kao heksozid ferulinske kiseline i triferuloil diheksoza u količini od  $29,9 \pm 7,6$  i  $30,9 \pm 3,4$   $\mu\text{g/g}$  s.tv. (tablica 1) (Vu i sur., 2018).

Flavonoidi su sekundarni metaboliti zaslužni za boju, miris i okus biljaka, odnosno biljnih plodova. Temeljnu strukturu flavonoida čine 2 benzenska prstena, koji se označavaju s A i B, te 1 šesteročlani prsten C. Biološka aktivnost flavonoida uvjetovana je prisutnošću hidroksilnih grupa koje su vezane na benzenski prsten B. Sintetiziraju se iz produkata acetatnog puta i puta šikiminske kiseline koji se spajaju u novi produkt (Liu i sur., 2022). Najčešće su prisutni kao spojevi s ugljikohidratima, odnosno glikozidi. Flavonoidi se dijele u 5 podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoni, antocijani i flavan-3-oli.

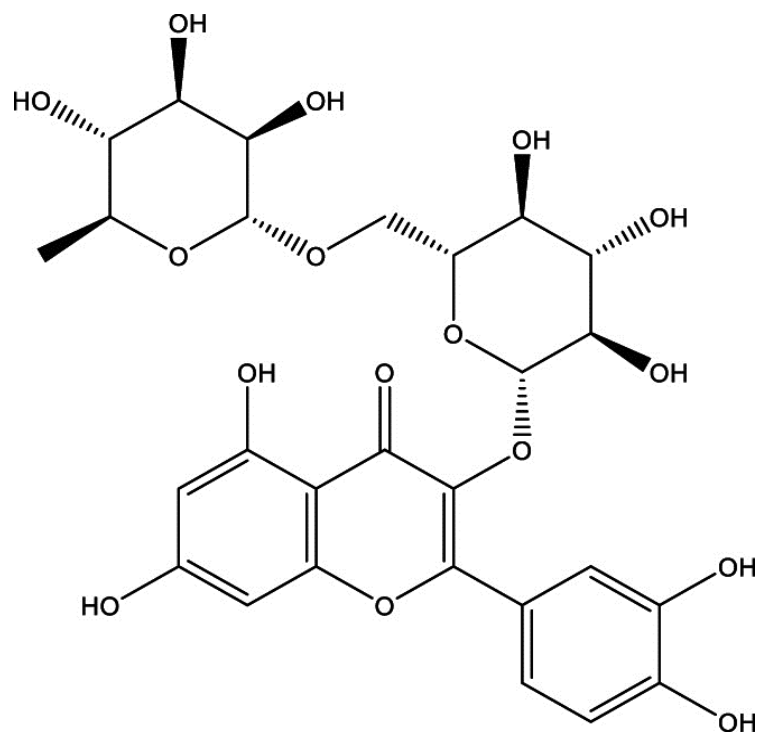
Flavonoli su najčešći flavonoidi, a njihova sinteza uvjetovana je sunčevom svjetlošću pa tako postoje razlike u koncentracijama ovih spojeva čak i kod biljaka iste vrste. Često su prisutni u kompleksu sa šećerima.

U kori banane najzastupljeniji flavonol je rutin ili 3',4',5,7- tetrahidroksiflavon-3-rutinozid (slika 2), u količini od  $482 \pm 206 \mu\text{g/g}$  s.tv. Rutin je prisutan u više od 70 biljnih vrsta te se često propisuje kod terapije varikoznih vena, unutarnjih krvarenja ili hemeroida, a utvrđeno je i da doprinosi stabilnost genoma. Pripisuje mu se antioksidacijski učinak u *in vivo* i *in vitro* sustavima, jer ima sposobnost hvatanja slobodnih radikala, pri čemu je antioksidacijska aktivnost ovisan o koncentraciji spoja. Valja reći kako rutin ima još protuupalne, antimikrobne, hipoglikemijske, antitumorske i antiasmatske učinke, koji su uvjetovani upravo antioksidacijskom aktivnošću koju posjeduje. Unatoč pozitivnim učincima rutina, velik problem predstavlja niska biološka dostupnost u organizmu zbog slabe topljivosti u vodi, nedovoljne stabilnosti i ograničene membranske propustljivosti (Gullon i sur., 2016). Nakon rutina prema zastupljenosti slijede: kamferol-3-rutinozid u količini od  $173,9 \pm 50 \mu\text{g/g}$  s.tv., izoramnetin-3-rutinozid u količini od  $139 \pm 73 \mu\text{g/g}$  s.tv., miricetin-deoksiheksosa-heksozid u količini od  $114 \pm 27 \mu\text{g/g}$  s.tv. te kvercetin-7-rutinozid u količini od  $75,2 \pm 14 \mu\text{g/g}$  s.tv. (tablica 1) (Vu i sur., 2018).

**Tablica 1.** Udjeli najzastupljenijih fenolnih kiselina i njezinih derivata te flavonola u ekstraktima kore banane (*prema Vu i sur., 2018*)

Naziv spoja (podskupina)	Udio ( $\mu\text{g/g}$ s.tv)
Triferuloil diheksosa (hidroksicimetna kiselina)	$30,9 \pm 3,4$
Heksozid ferulinske kiseline (hidroksicimetna kiselina)	$29,9 \pm 7,6$
Ferulinska kiselina (hidroksicimetna kiselina)	$11,9 \pm 1,2$
Rutin (flavonol)	$482 \pm 206$
Kamferol-3-rutinozid (flavonol)	$173,9 \pm 50$
izoramnetin-3-rutinozid (flavonol)	$139 \pm 73$
miricetin-deoksiheksosa-heksozid (flavonol)	$114 \pm 27$
kvercetin-7-rutinozid (flavonol)	$75,2 \pm 14$

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 2.** Kemijska struktura rutina (prema Rahmani i sur., 2023)

Flavoni su prisutni kao glikozidi i polimetoksilirani flavoni, a flavanoni su najčešće zastupljeni u kompleksu sa šećerima. Od flavanona, u kori banane potvrđen je i naringenin. Antocijani mogu postojati kao esteri kiselina, glikozidi, aglikoni ili fenolne kiseline.

Flavan-3-oli zastupljeni su u većini biljnih vrsta, a obuhvaćaju veliku skupinu strukturalno različitih spojeva. Obuhvaćaju epikatehin, katehin, galokatehin, epikatehin-3 galat, epigalokatehin galat i procijanidine. U kori banane prisutni su kao monomeri, dimeri i polimeri ili tanini. Prema Vu i sur. (2018), u dosadašnjim su istraživanjima najzastupljeniji bili proantocijanidini kao polimeri, primjerice prodelfidin. Nakon toga, slijedili su dimeri, među kojima je najzastupljeniji bio procijanidin B2, a od monomera je najzastupljeniji bio galokatehin. Od ostalih flavan-3-ola, dosada su utvrđeni još epikatehin te procijanidin B1 i B4.

Rebello i sur. (2014) u brašnu kore banane ekstrahirali su ukupno 29 mg GAE/g uzorka ukupnih fenolnih spojeva te su zaključili da visoka koncentracija ukupnih fenola potječe upravo od visoke zastupljenosti flavonoida. Potvrdili su prisutnost visokopolimeriziranih prodelfidina, flavanol glikozida, većinom rutinozida i spojeva s kvercetinom, dimera procijanidina i monomera flavan-3-ola.



#### 2.2.4. Upotreba kore banane kao nusproizvoda prerade

Kora banane koristi se za prehranu životinja, primjerice koza, majmuna, peradi, ribe i zečeva. Visok sadržaj proteina, ugljikohidrata, masti i vlakana čini je pogodnom sirovinom za proizvodnju stočne hrane, a mikrobna fermentacija omogućuje dodatna poboljšanja nutritivne vrijednosti hrane (Zou i sur., 2022). Nastavno na visok sadržaj vlakana, kora banane pogodna je za izradu ambalaža za hranu. Radi se o jestivim i lako razgradivim filmovima koji su izrađeni od polimera kore banane te kukuruznog škroba, a njihovim je dodatkom pojačana čvrstoća ambalaže i smanjena cijena izrade (Zaini i sur., 2022).

Kora ima viši sadržaj askorbinske kiseline od ploda i pulpe pa se često pretvara u brašno i dodaje proizvodima za njegu lica. Nadalje, brašno kore banane koristi se kao prehrambeni aditiv u pekarskim proizvodima jer poboljšava okus, teksturu i sastav finalnog proizvoda (Zaini i sur., 2020). Kolačići koji su sadržavali brašno kore banane imali su veći sadržaj vlakana i antioksidansa te su bili bolje prihvaćeni kod potrošača nego kolačići bez brašna kore banane (Alshehry, 2023; Ansari i sur., 2023). Ansari i sur. (2023) ističu mogućnost proizvodnje limunske kiseline iz kore banane pomoću plijesni *Aspregillus niger* te proizvodnju niskokalorijskih kolačića, jer je utvrđeno da se dodatkom brašna kore banane kao aditiva smanjuje količina masti u finalnom proizvodu. Trenutna upotreba kore banane u prehrambenoj industriji je kao aditiva za poboljšanje nutritivnog profila proizvoda poput peciva, mesnih prerađevina i želea. Brašno kore banane pokazalo se kao uspješna zamjena za pšenično brašno u proizvodnji tradicionalnog egipatskog kruha i funkcionalnih kolačića poboljšanjem svojstava tijesta (Zou i sur., 2022; Mostafa, 2021).

Visok sadržaj kalcija, fosfora i kalija može omogućava upotrebu ekstrakta kore banane u proizvodnji gnojiva kako bi se povećala plodnost tla. Miješanje gnojiva peradi i ekstrakta kore banane, uz djelovanje crva, rezultirat će stvaranjem organskog gnojiva s visokim udjelom kalija i dušika, što ga čini pogodnim za uzgoj različitih vrsta biljaka (Padam i sur., 2014). Mogućnost proizvodnja etanola iz biomase pomoću kvasca i plijesni koji fermentiraju koru banane dodatan je razlog za iskorištenje ovog nusproizvoda. Pored toga, kora banane može se iskoristiti za proizvodnju bioplina fermentacijskim procesima (Zou i sur., 2022).

Celuloza i ugljična pjena iz kore banane imaju mogućnost apsorpcije metala poput bakra, kadmija, olova i kroma pa je moguće eliminirati štetne metale iz industrijskih voda, što je posebno važno u industriji prerade ribe i ribljih proizvoda.

Metanolni ekstrakti dobiveni iz kore banane pomoću tradicionalnih metoda ekstrakcije koje su koristili domorodci u Nigeriji pokazali su se uspješnima u borbi protiv bakterije *Klebsiella pneumoniae*, koja se često može naći u crijevima pojedinaca koji su učestalo konzumirali antibiotike pa je moguće zaključiti kako spojevi iz kore banane imaju i antimikrobno djelovanje

(Zou i sur., 2022).

Ekstrakt kore banane pripremljen pomoću heksana kao otapala pokazao se uspješnim inhibitorom rasta stanica karcinoma kolona kod ljudi, dok je ekstrakt kore banane pripremljen pomoću metanola pokazao potencijal u hvatanju slobodnih radikala kao antioksidans te u borbi protiv stanica karcinoma dojke. Antikancerogena aktivnost ekstrakta kore banane povezuje se s bogatim sadržajem flavonoida u ekstraktima (Zou i sur., 2022).

Kora banane dugo se vremena koristi za liječenje opekline, čireva, kašlja i dijareje, kao i za smanjenje oteklina i boli te smanjenje svrbeža nakon uboda komaraca. Zahvaljujući sadržaju bioaktivnih spojeva u kori banane, među kojima se ističu flavonoidi, tanini, glikozidi, alkaloidi i terpenoidi, kori banane mogu se pripisati antibakterijska, antidijabetička, antihipertenzivna i protuupalna svojstva, što upućuje na učestaliju primjenu kore banane u farmaceutskoj industriji u budućnosti (Zou i sur., 2022). Kora banane sadrži mnoštvo fenolnih spojeva koji se povezuju sa smanjenjem rizika od pojave dijabetesa, komplikacija pretilosti, kardiovaskularnih bolesti i karcinoma. Upotreba fenolnih spojeva kao funkcionalnih aditiva hrani temelji se na mogućnosti da zaustave oksidaciju lipida u organizmu, što može dovesti do ateroskleroze, a povezuju se i sa sprječavanjem rasta štetnih mikroorganizama u hrani. Prisutnost 2-metil-5-(1-metiletil)-fenola u ekstraktu kore banane rezultirala je inhibicijom aktivnosti slijedećih bakterijskih sojeva: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Stoga, moguće je zaključiti kako će u budućnosti upotreba kora banane kao nusproizvoda prerade ići u smjeru ekonomski i ekološki prihvatljive izolacije fenolnih spojeva za proizvodnju funkcionalnih prehrambenih proizvoda, dodataka prehrani ili antimikrobnih agenasa (Zou i sur., 2022).

### 2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Fenolni spojevi imaju široku upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog antioksidacijske aktivnosti koju posjeduju. Ipak, da bi se dobili biljni ekstrakti visoke kvalitete sa zadovoljavajućim sadržajem fenolnih spojeva, potrebno je osigurati optimalne uvjete ekstrakcije. Također, važno je i da izolacija spojeva bude u skladu sa standardima zaštite okoliša. Nastavno na zaštitu okoliša, upotreba visoko učinkovitih metoda izolacije bioaktivnih spojeva omogućila bi dobivanje izolata visoke kvalitete iz nusproizvoda industrijske prerade hrane, čime bi se smanjila količina otpada od hrane koja se stvara. Kod ekstrakcije fenolnih spojeva potrebno je imati na umu i oblik u kojem su spojevi prisutni u biljkama. Fenoli mogu biti prisutni kao monomeri ili polimeri, u obliku aglikona ili glikozida te mogu biti otopljeni u staničnom matriksu ili vezani na određene stanične strukture (Shi i sur., 2022). Također, sastav i količina fenolnih spojeva variraju obzirom na vrstu biljke, vrstu stanica i uvjete rasta pa je cilj pažljivim izborom metode za ekstrakciju dobiti ekstrakte bogate polifenolima. Postoje dvije

velike skupine tehnika za ekstrakciju, a to su konvencionalne i alternativne tehnike (Osorio-Tobón, 2020).

### 2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva

Konvencionalne tehnike ekstrakcije baziraju se na zakonima sličnosti i međusobnog miješanja kako bi se željeni spojevi prenijeli u otapalo. Među konvencionalnim metodama ističu se infuzija, ekstrakcija po Soxhletu, maceracija i digestija (Shi i sur., 2022). Infuzija je jednostavna tehnika za ekstrakciju hlapljivih biljnih uzoraka koji sadržavaju spojeve lako topljive u organskom otapalu, a ekstrakcija po Soxhletu koristi se za ekstrakciju masti iz uzoraka. Maceracija se koristi za ekstrakciju sirovog materijala tijekom duljeg vremena pri niskim temperaturama, dok se digestija koristi za ekstrakciju termostabilnih fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Ekstrakcija fenolnih spojeva predstavlja izazov, jer se radi o spojevima čiji konačan prinos i biološka aktivnost ovise o parametrima ekstrakcije, kao što su temperatura i vrijeme ekstrakcije te okolišnim parametrima, poput svjetla ili kisika. Osnovna prednost konvencionalnih tehnika je jednostavnost izvedbe. Primjerice, kod ekstrakcije pod Soxhletu nije potrebno provoditi filtraciju uzorka nakon ekstrakcije. Također, uzorak opetovano dolazi u kontakt s otapalom koje se refluksira pa nije potrebna velika količina otapala. Međutim, nedostaci ove tehnike su dugo vrijeme i visoka temperatura ekstrakcije, što može rezultirati smanjenjem biološke aktivnosti polifenola. Prednosti maceracije su jednostavnost, ekonomičnost i niske temperature ekstrakcije, čime je moguće očuvati aktivnost fenolnih spojeva. Također, veći prinos spojeva može se ostvariti upotrebom inkubatora za miješanje da bi se povećala dodirna površina otapala i uzorka. Ipak, to nije dovoljno za dobivanje ekstrakta s visokom koncentracijom fenolnih spojeva, što je glavni nedostatak (Osorio-Tobón, 2020). Digestija ili modificirana maceracija, ograničena je samo na ekstrakciju fenola koji su termostabilni, a za uspješnu ekstrakciju šireg spektra bioaktivnih spojeva, potrebno je primijeniti niz otapala različite polarnosti. Dakle, tehnika je duga, iscrpna i neekonomična, a jedina je prednost primjena niskih temperatura ekstrakcije (Alara i sur., 2021). Zbog brojnih nedostataka konvencionalnih tehnika, razvijene su alternativne ili napredne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva, a konvencionalne tehnike ostale su u upotrebi za usporedbu efikasnosti naprednih tehnika.

### 2.3.2. Napredne tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva

Napredne tehnike ekstrakcije razvijene su kako bi se spriječio mogući utjecaj vanjskih faktora, poput kisika i svjetla, na koncentraciju fenolnih spojeva u finalnom ekstraktu te kako bi se zaobišli nedostaci konvencionalnih metoda. Među alternativnim tehnikama najčešće su

MAE, tekućinska ekstrakcija pod tlakom, superkritična ekstrakcija fluidima i ekstrakcija pomoću ultrazvuka. Spomenute tehnike imaju nekoliko zajedničkih odrednica, a to su ekološka prihvatljivost, upotreba malih količina otapala, umjerene temperature i kratko vrijeme ekstrakcije (Osorio-Tobón, 2020).

MAE je tehnika koja se temelji na razbijanju stanične stijenke biljnog materijala energijom mikrovalova kako bi se iz stanica oslobodili polifenoli. Uzorak, otapalo i magnetni mješači dodaju se u mikrovalni reaktor koji je otporan na zračenje. Uređaj se podešava na odgovarajuću snagu, vrijeme zagrijavanja i temperaturu, ovisno o vrsti spojeva koji se izoliraju. Mikrovalno elektromagnetsko zračenje zagrijava smjesu uzorka i polarnog otapala, pri čemu otapalo apsorbira energiju mikrovalova te se smjesa uzorka i otapala zagrijava brže. Iako se najčešće koriste biljni uzorci koji se prethodno suše, takvi uzorci i dalje sadržavaju tragove vode u sebi. Energija mikrovalova zagrijava tu unutarstaničnu vodu koja posljedično isparava. Isparavanje povećava unutarstanični tlak koji stvara pritisak na staničnu stijenk. Vremenom će povećani tlak uzrokovati pucanje stanične stijenke, čime se omogućava prijenos polifenola u otapalo i penetracija otapala u stanični matriks. Dakle, kod ove tehnike događa se prijenos stanične mase i topline prema van (Lama - Muñoz i Contreras, 2022; Cavalloro i sur., 2021).

Prinosi ekstrakcije uvelike ovise karakteristikama ekstrakcijskog otapala. Poželjno je da je ekstrakcijsko otapalo selektivno za ciljane polifenolne spojeve, a inertno prema ostalim komponentama staničnog matriksa. Na taj će se način upotrijebiti manje otapala i ekstrakcija će biti uspješnija (Lama - Muñoz i Contreras, 2022). Najčešće se koriste vodene otopine etanola i metanola u različitim omjerima koje imaju visok stalni dipolni moment i visoku dielektričnu konstantu, što omogućuje bolje otapanje ciljanih spojeva u otapalu (Osorio-Tobón, 2020.). Dipolni moment ( $\rho$ ) je vektorski zbroj električnih dipolnih momenata pojedinih dipola. Veći je što su veći električni naboji i udaljenost polova. Stalni dipolni moment imaju asimetrične molekule kojima se težišta pozitivnog i negativnog naboja ne poklapaju, primjerice etanol. Ipak, učinkovitost ekstrakcije ponajprije je uvjetovana dielektričnom konstantom otapala koja uvjetuje potencijal otapala da apsorbira energiju mikrovalova i tako se zagrije. Povećanjem dielektrične konstante otapala, primjerice razrjeđivanjem alkohola određene koncentracije vodom, povećava se apsorpcija mikrovalnog zračenja, što rezultira povećanjem temperature i tlaka unutar uzorka i pucanjem staničnih struktura (Lama - Muñoz i Contreras, 2022).

Pored karakteristika otapala, važno je optimirati slijedeće parametre: temperaturu i vrijeme ekstrakcije, omjer uzorka i otapala te snagu mikrovalnog zračenja. Temperatura utječe na topljivost spojeva, brzinu desorpcije i stabilnost ciljanih spojeva. Dakle, viša temperatura poboljšava difuziju otapala u stanični matriks, povećava topljivost spojeva i ubrzava njihovu desorpciju iz matrice, što omogućuje učinkovitiju i bržu ekstrakciju spojeva, ali može uzrokovati degradaciju osjetljivih spojeva zbog čega je važno definirati optimalnu za različite uzorke.

Najveća prednost MAE u odnosu na konvencionalne tehnike je upravo kratko vrijeme ekstrakcije, najčešće 5 do 15 min. Kraće vrijeme ekstrakcije sprječava oksidaciju i toplinsku degradaciju ciljanih spojeva, a postiže se bržim zagrijavanjem otapala. Brzina zagrijavanja otapala ovisit će o spomenutoj dielektričnoj konstanti. Iako se produljenjem ekstrakcije može povećati prinos spojeva, preduga ekstrakcija može uzrokovati degradaciju ciljanih spojeva. Omjer uzorka i otapala važan je parametar kod MAE jer će dovoljan volumen otapala omogućiti adekvatno otapanje uzorka i ekstrakciju ciljanih spojeva (Shi i sur., 2022). Snaga mikrovalova važan je parametar kod MAE, jer omogućava otpuštanje bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala, a važno je optimirati kako bi se spriječilo prekomjerno zagrijavanje uzorka i degradacija termolabilnih polifenola (Vu i sur., 2019). Ova se tehnika pokazala posebno korisnom kod ekstrakcije fenolnih kiselina i flavonoida koji dijele sličnosti u strukturi (Alara i sur., 2021).

## 2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Vanjski čimbenici poput zagađenja u okolišu, izlaganja radijaciji i oksidirajućim sredstvima te ubrzan način života kumulativno doprinose razvoju oksidativnog stresa u organizmu. Osim toga, u stanicama se prirodno događaju procesi oksidacije zbog iskorištavanja hranjivih tvari, sinteze staničnih struktura ili pak kao posljedica bolesti, što rezultira stvaranjem slobodnih radikala koji mogu uzrokovati oštećenja stanica (Zou i sur., 2022). Slobodni radikali su zapravo reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poput vodikovog peroksida, superoksidnog aniona, hidroksilnog radikala i perhidroksilnog radikala. Kako sam naziv kaže, ovi spojevi u svom sastavu imaju kisik, a zbog svoje nestabilnosti teže reakciji s drugim spojevima iz okoline. Spomenuti radikali mogu izazvati oksidativna oštećenja nukleinskih kiselina te strukturalnih proteina, masti i tkiva te potaknuti razvoj kardiovaskularnih bolesti ili narušiti funkcije stanica, tkiva i organa. Stoga je unos antioksidansa kroz hranu, funkcionalne prehrambene proizvode ili dodatke prehrani presudan za očuvanje, normalan rast i obnovu staničnih struktura (Zaini i sur., 2022).

Antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturi spoja, vezanim funkcionalnim skupinama i stupnju polimerizacije, kao i stupnju zrelosti voća. Utvrđeno je kako se antioksidacijska aktivnost povećava dozrijevanjem voća, ali se smanjuje nakon što voće prezrije. Antioksidacijska aktivnost uvjetovana je i kultivarom banane pa tako vrijednosti mogu varirati 0,04 – 13,94 mg TE/g svježeg uzorka, mjereno FRAP metodom (Qamar i Shaikh, 2018). Antioksidacijska aktivnost fenola počiva na hvatanju ROS-a zahvaljujući prisustvu hidroksilnih skupina, prevenciji formiranja ROS-a, regulaciji sinteze antioksidacijskih enzima, te regulaciji ekspresije gena koji uvjetuju metabolizam, preživljavanje i diferencijaciju adipocita te aktivnost detoksikacijskih enzima (Shi i sur., 2022).

Polifenoli mogu potaknuti sintezu superoksid dismutaze 1 (eng. *superoxide dismutase 1*, SOD1) u citosolu i superoksid dismutaze 2 (eng. *superoxide dismutase 2*, SOD2) u mitohondrijima i na taj način potaknuti antioksidacijsku aktivnost hvatanjem slobodnih radikala. Antioksidacijska aktivnost fenola posreduje njihovu protuupalnu aktivnost kroz inhibiciju aktivnosti proupalnih enzima, aktivaciju endogenih antioksidacijskih enzima i modifikaciju gena za opstanak stanica. Primjer protuupalne aktivnosti fenola očituje se kod puta arahidonske kiseline koja sudjeluje u aktivaciji upalnih puteva u organizmu. Kada polifenoli aktiviraju receptor za aktivator proliferacije peroksisoma gama (eng. *peroxisome proliferator-activate receptor gamma*, PPAR $\gamma$ ), koji djeluje kao transkripcijski faktor u regulaciji ekspresije gena koji reguliraju metabolizam lipida i glukoze, inhibiraju se enzimi koji sudjeluju u konverziji arahidonske kiseline u proupalne metabolite. Na taj se način sprječavaju proupalni mehanizmi koji mogu narušiti diferencijaciju adipocita, potaknuti metaboličke poremećaje u kostima ili potaknuti gubitak mišićne mase skeletnih mišića (Dobroslavić i sur., 2023).

Kora banane bogata je fenolnim spojevima koji imaju antioksidacijsko djelovanje u organizmu, među kojima se ističu: hidroksicimetne kiseline, kamferol, rutin i galokatehin (Vu i sur., 2018). Hidroksicimetne kiseline povezuju se sa smanjenjem progresije osteoporoze u *in vivo* eksperimentima na štakorima te *in vitro* eksperimentima na staničnim linijama koštane srži, kao i sa inhibicijom oksidativnog stresa i upale povezane s artritisom. Kamferol se povezuje s regeneracijom kostiju i očuvanjem osteoblasta u stanicama štakora u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Dobroslavić i sur., 2023). Rutin ima snažnu antioksidacijsku i protuupalnu aktivnost, a najčešće se koristi kod snižavanja krvnog tlaka i terapije proširenih vena, a ima i neuroprotektivno djelovanje koje počiva na regulaciji aktivnosti antioksidacijskih enzima poput katalaze i superoksid dismutaze (Bakhtiari i sur., 2017).

Visok sadržaj polifenola koji imaju antioksidacijsko djelovanje omogućuje neutralizaciju djelovanja slobodnih radikala u organizmu. Danas se koristi velik broj metoda koje mjere prijenos atoma vodika ili elektrona s antioksidanasa na molekule slobodnih radikala kako bi se neutralizirale (Munteanu i Apetrei, 2021).

Kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost neke prehrambene sastavnice, metoda za određivanje mora zadovoljiti slijedeće kriterije: jednostavnost izvedbe, lako dostupni instrumenti i kemikalije za izvedbu, definirana krajnja točka i kemijski mehanizam, ponovljivost, može se podvrgnuti kontroli kvalitete, radikal mora biti biološki važan te mora biti moguća analiza hidrofилnih i hidrofobnih antioksidanasa. Također, uvijek je potrebno testirati antioksidacijsku aktivnost višestrukim metodama kako bi se dobili vjerodostojni rezultati. Glavni nedostatak svih metoda je da ne mogu u potpunosti oponašati antioksidacijsku aktivnost u *in vivo* uvjetima ili u hrani. Spomenute metode oslanjaju se na spektrofotometriju, pretpostavljajući pojavu karakterističnih boja ili obezbojenje otopina nakon dodatka karakterističnih reagensa, a te

promjene prate se mjerenjem apsorbancije pri određenoj valnoj duljini (Munteanu i Apetrei, 2021).

FRAP je kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, a temelji se na reakciji redukcije trovalentnog iona željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u dvovalentni ion željeza u doticaju s antioksidansima prisutnima u uzorku. Stabilnost iona željeza uvjetovana je kiselim pH. Mjerenje apsorbancije provodi se pri valnoj duljini 593 nm (Mishra i sur., 2022). Metoda je jednostavna, brza, ponovljiva metoda, dobro validirana, visoko osjetljiva i često se koristi za dobivanje informacija o antioksidacijskoj aktivnosti hrane i pića. Važno je reći i kako je metoda jeftina te ne zahtijeva posebnu opremu za izvedbu. Nedostatak metode je mogućnost velikih varijacija u apsorbancijama uzoraka, ovisno o potrebnom vremenu za reakcije radikala i antioksidansa, što otežava usporedbu rezultata s rezultatima drugih metoda. Dakle, različiti antioksidansi imaju različita reakcijska vremena za detekciju radikala. Međutim, taj se nedostatak može nadići elektrokemijskim prilagodbama metode. Nedostaci FRAP metode su niska učinkovitost u uklanjaju radikala u hidrofobnim sustavima i niska korelacija s drugim antioksidacijskim metodama. Stoga je potrebno koristiti FRAP test zajedno s nekom drugom metodom kako bi se utvrdile razlike u antioksidacijskim mehanizmima (Munteanu i Apetrei, 2021).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti često se koristi još jedna kolorimetrijska metoda, ABTS metoda. Temelji na redukciji ABTS radikala antioksidansima prisutnima u uzorku, što se očituje promjenom boje pripremljene smjese uzorka i otopine reagensa. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm. ABTS radikal ili  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  nastaje oksidacijom ABTS-a kalijevim persulfatom ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) ili manganovim (II) oksidom ( $\text{MnO}_2$ ). Persulfat ili manganov dioksid djeluju kao oksidansi pa prevode ABTS u  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , pri čemu radikal ima intenzivnu plavo-zelenu boju koja apsorbira svjetlost na valnoj duljini 734 nm. Miješanjem odgovarajućeg volumena uzorka i otopine reagensa, dolazi do redukcije radikala ABTS-a u neutralni oblik jer antioksidansi preuzimaju nespareni elektron, što se očituje smanjenjem obojenja smjese. Apsorbancija smjese uzorka i reagensa mjeri se na valnoj duljini 734 nm nakon 4 – 6 min. Prednosti ove metode su jednostavno izvođenje, brzina, pristupačna cijena, stabilnost u širokom rasponu pH i fleksibilnost zbog mogućnosti analize antioksidacijske aktivnosti u lipofilnim i hidrofilnim ekstraktima (Shi i sur., 2022; Munteanu i Apetrei, 2021). Nedostatak metode je manjak biološke važnosti  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , jer se radi o sintetiziranom radikalima. Nadalje, postoji mogućnost precjenjivanja antioksidacijske aktivnosti zbog reakcije ispitivane tvari s oksidansima, enzimima i kationskim radikalima te niskog redoks potencijala brojnih polifenola, što omogućuje laku reakciju s  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Također, postoji mogućnost podcjenjivanja antioksidacijske aktivnosti zbog vremenskog ograničavanja reakcije, odnosno, definiranja krajnje točke reakcije nakon samo 4 – 6 min, jer je različitim antioksidansima potrebno različito vrijeme za reakciju s radikalima (Munteanu i Apetrei, 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Zadatak je bio ispitati utjecaj uvjeta MAE na prinos fenolnih spojeva iz kore banane, odnosno optimirati uvjete za ekstrakciju kako bi se dobili što veći prinosi u vidu izolacije fenolnih spojeva. Uzorak je bila liofilizirana kora banane, a kao otapalo za ekstrakciju korištena je 30 %-tna vodena otopina etanola. U dobivenim ekstraktima određeni su udjeli THA i TF te antioksidacijska aktivnost pomoću FRAP i ABTS metoda.

#### 3.1. MATERIJALI I LABORATORIJSKA OPREMA

##### 3.1.1. Uzorak kore banane

Za istraživanje su korištene kore banane sorte Cavendish. Kore su zamrznute pri – 80 °C nakon čega su liofilizirane, pakirane u vrećice te skladištene na suhom i tamnom mjestu. Neposredno prije provođenja analiza, uzorci su usitnjeni u električnom mlincu (GT11 Tefal, Rumily, Francuska).

##### 3.1.2. Kemikalije i standardi

- Kolin klorid 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Mliječna kiselina 99 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Destilirana voda
- Koncentrirana klorovodična kiselina (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 37 %
- Etanol (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 96 %
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L (u 96 % etanolu)  
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L  
Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Kruti kvercetin
- 100 %-tni metanol (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD)
- Standardna otopina kvercetina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) (100 mg/L)  
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL



100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Kruta klorogenska kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Aluminijev klorid (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 10 %-tni

Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid–heksahidrat, p.a.) otopi se 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)

- Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6

Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. 500 mg Troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježije pripremljena otopina standarda.

- 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $K_2S_2O_8$  (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

Priprema: 0,1892 g  $K_2S_2O_8$  izvažuje se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.

- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska) kiselina)(Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

- 7 mM ABTS otopina

Priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- stabilna ABTS•+ otopina

Priprema: 88  $\mu$ L  $K_2S_2O_8$  otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija  $K_2S_2O_8$  pri tome je 2,45 mmol/L.

- Na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+

Priprema: 1000  $\mu$ L ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbanacija pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

### 3.1.3. Laboratorijsko posuđe

- Staklene čaše, volumena 25 i 1000 mL
- Metalna žličica za uzimanje suhog uzorka
- Plastična lađica za vaganje krutog reagensa
- Odmjerne tikvice, volumena 10, 100 i 2000 mL
  - Menzure, volumena 50 mL

- Stakleni lijevci
- Magnetni štapić
- Stakleni štapić
- Magnetni mješači
- Plastična kapaljka
- Filter papir
- Plastične epruvete (Falcon) s poklopcem volumena 50 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Pipete (100 i 1000  $\mu$ L, 5 mL)
- Plastični nastavci za pipete (Eppendorf)
- Staklene kivete
- Staklena čaša od 1000 mL

#### 3.1.4. Laboratorijski uređaji

- Električni mlinac (180W/230V, Tefal)
- Analitička vaga (Mettler Toledo d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Uređaj za MAE (MILESTONE Ethos X, Sorisole (BG), Italija)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Kupelj UP 400 S (Dr. Hielscher GmbH, Njemačka)
- Uređaj za spektrofotometriju (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VMR International, Radnor, SAD)

### 3.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA MIKROVALOVIMA

Ekstrakcija fenolnih spojeva mikrovalovima provedena je prema planu eksperimenta (tablica 2). Odvagana je potrebna masa liofiliziranog uzorka prema zadanim omjerima uzorka i otapala (g/mL): 1:40 = 1,25 g; 1:50 = 1 g; 1:60 = 0,83 g. Odvagani uzorak prenijet je u ćeliju za ekstrakciju te mu je dodano 40 mL ekstrakcijskog otapala i magnetni mješač. Za odvagavanje uzorka korištena je analitička vaga, a masa je određena s preciznošću na 4 decimale. Ekstrakcijska ćelija sa smjesom postavljena je u reaktor (slika 3), a parametri ekstrakcije su postavljeni na slijedeće vrijednosti: snaga mikrovalova bila je 400 W, a snaga miješanja 50 %. Vrijeme zagrijavanja do željene temperature bilo je 2 min za 40 °C, 4 min za 60 °C, 6 min za 80 °C, ventilacija i hlađenje nakon ekstrakcije u trajanju od 1 min na temperaturi od 25 °C.

**Tablica 2.** Plan eksperimenta za MAE.

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (min)
1	1:40	40	5
2			10
3			15
4		60	5
5			10
6			15
7		80	5
8			10
9			15
10	1:50	40	5
11			10
12			15
13		60	5
14			10
15			15
16		80	5
17			10
18			15
19	1:60	40	5
20			10
21			15
22		60	5
23			10
24			15
25		80	5
26			10
27			15

Po završetku ekstrakcije, smjesa se profiltrirala vakuum filtracijom pomoću Büchnerovog lijevka, prenijela u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunila otapalom do oznake. Dobiveni filtrati prenijeti su u plastične Falcon kivete s čepom i pohranjeni u hladnjak do provođenja analiza.

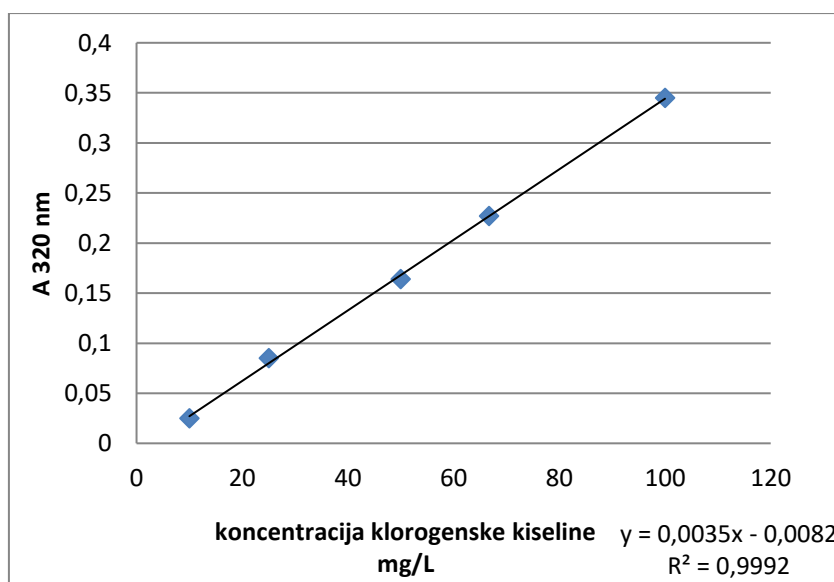
### 3.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA

Hidroksicimetne kiseline pripadaju skupini fenolnih kiselina, a ukupne hidroksicimetne kiseline mogu se odrediti spektrofotometrijski. Pri valnoj duljini od 320 nm mjeri se intenzitet nastalog obojenja u ekstraktu uzorka (Howard i sur., 2003).

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 250  $\mu$ L ekstrakta, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti je način pripremljena i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Svaki uzorak je analiziran u 2 paralele.

Kako bi se mogla odrediti koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina, bilo je potrebno izraditi baždarni pravac pomoću standarda klorogenske kiseline. Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline masene koncentracije 100 mg/L, pripremljena su slijedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L. Dobivena su tako da se iz otopine alikvota otpipetira redom 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Potrebno je pripremiti i slijepu probu tako da se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol. Za mjerenje je bilo potrebno otpipetirati 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl u staklenu epruvetu. Iz staklene epruvete, određeni je volumen analita prenijet u kivetu te je određena apsorbancija na 320 nm. Na temelju dobivenih rezultata, dobivena je jednadžba pravca u koju su se uvrštavali rezultati apsorbancije ekstrakta uzorka.

Jednadžba pravca dobivena je pomoću programa Microsoft Excel tako da su koncentracije klorogenske kiseline bile vrijednosti na osi apscisa, a izmjerene apsorbancije pri 320 nm bile su vrijednosti na osi ordinata (slika 4).



Slika 4. Baždarni dijagram klorogenske kiseline

$$Y = 0,0035X - 0,0082 \quad R^2 = 0,9977 \quad [1]$$

Y = apsorbancija pri 320 nm

X = koncentracija klorogenske kiseline (mg/L)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

Koncentracije THA izražene su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja, u miligramima ekvivalenta klorogenske kiseline na 100 grama uzorka (mg CGA/100 g uzorka).

### 3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

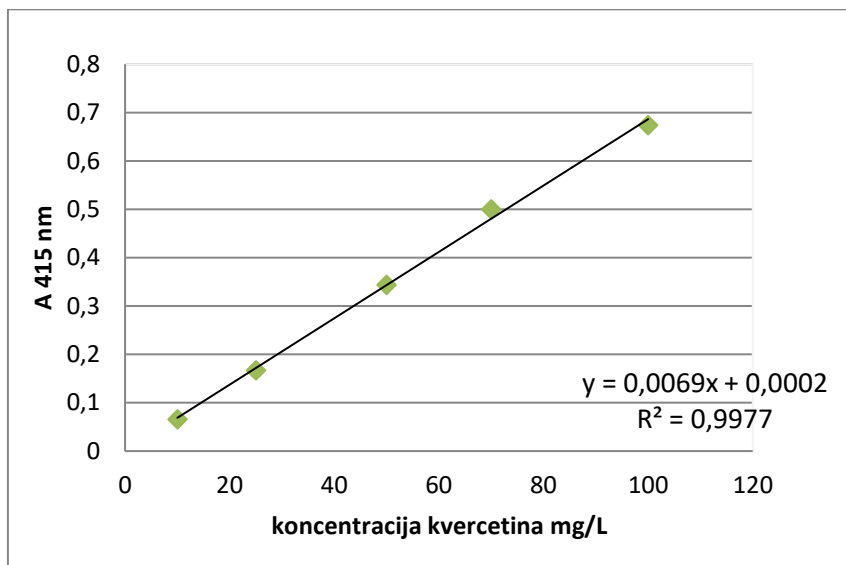
Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom, nakon čega se mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 415 nm pomoću spektrofotometra (Chang i sur., 2002).

Uzorci u plastičnim Falcon kivetama su promiješani pomoću Vortex miješalice, nakon čega je u staklenu epruvetu otpipetirano redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Da bi se dobili precizniji rezultati, mjerenje se provodi u 2 paralele. a isti je način pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta uzeto otapalo za ekstrakciju te umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Sve reakcijske smjese u epruvetama su promiješane pomoću Vortex miješalice po završetku pripreme. Reakcijska smjesa odstajala je 30 min, nakon čega je slijedilo mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 415 nm.

Za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida, kao i kod hidroksicimetnih kiselina, bilo je potrebno izraditi baždarni pravac. Za izradu baždarnog pravca, upotrijebljena je otopina kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od standardne otopine kvercetina pripremljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetiralo redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standarda u svaku tikvicu i nadopunilo do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u razrijeđenim otopinama iznosile su 10, 25, 50 i 70 mg/L. Za analizu je bilo potrebno uzeti i alikvotnu otopinu standarda koncentracije 100 mg/L. Iz svake tikvice otpipetirano je redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti se način pripremila i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta dodao 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodao isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa morala je odstajati 30 minu da bi se mogla izmjeriti apsorbancija pri 415 nm pomoću spektrofotometra.

Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzete su kao vrijednosti na osi ordinata, a koncentracije kvercetina (mg/L) uzete su kao vrijednosti na osi apscisa da bi se mogao dobiti grafički prikaz

u programu Microsoft Excel. Kao grafički prikaz dobiven je pravac (slika 5), a prema jednadžbi pravca izračunate su koncentracije ukupnih flavonoida te su izražene u mg ekvivalenta kvercetina na 100 g uzorka (mg QCT/100 g uzorka) kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.



**Slika 5.** Baždarni dijagram kvercetina

$$Y = 0,0069X + 0,002$$

$$R^2 = 0,9992 \quad [2]$$

Y – apsorbancija pri 415 nm

X – koncentracija kvercetina (mg/L)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

### 3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

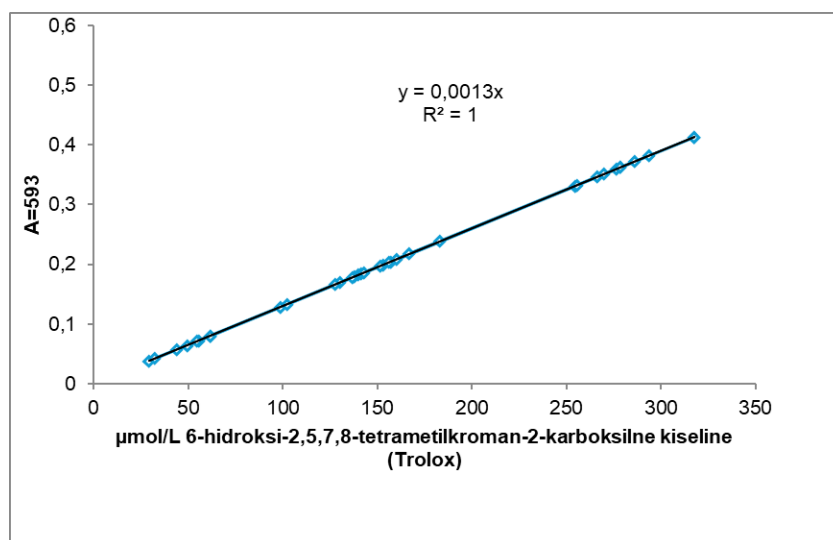
Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom izražene su preko trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Uzorci u plastičnim Falcon kivetama promiješani su pomoću Vortex miješalice. Ekstrakt kore banane razrijeđen je otapalom za ekstrakciju 5 puta.

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u epruvetu je otpipetirano redom 240 µL destilirane vode, 80 µL razrijeđenog uzorka i 2080 µL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci promiješani su pomoću Vortex miješalice te su termostimirani 5 min pri temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji.

Slijepa proba pripremljena je tako da je dodano sve osim uzorka, umjesto kojeg je dodano otapalo za ekstrakciju, odnosno 30 %-tni etanol. Nakon termostatiranja slijedilo je mjerenje apsorbancije pri 593 nm.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka, bilo je potrebno izraditi baždarni pravac s vrijednostima antioksidacijske aktivnosti standardne otopine. U 96 %-tnom etanolu se otopljeno je 0,0501 g Troloxa u odmjernoj tikvici od 100 mL te je tikvica nadopunjena do oznake. Na taj način dobivena je 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje su se u odmjernim tikvicama (10 mL) radila razrjeđenja na sljedeći način: u tikvice je redom otpipetirano 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice su zatim nadopunjene 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznosile su 25, 100, 125, 250, 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$  akon toga se u staklene epruvete otpipetiralo 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa određene koncentracije i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci izmiješani su pomoću Vortex miješalice pa termostatirani pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola. Uslijedilo je mjerenje apsorbancije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtan je baždarni pravac (slika 6) pomoću programa Microsoft Excel, pri čemu su na apscisi označene koncentracije Troloxa ( $\mu\text{mol/L}$ ), dok su se na ordinati nalazile izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm.



**Slika 6.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

$$Y = 0,0013X$$

$$R^2 = 0,9995$$

[3]



Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{mol/L}$ )

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

Antioksidacijska aktivnost izražena je u mmol TE/100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ABTS METODOM

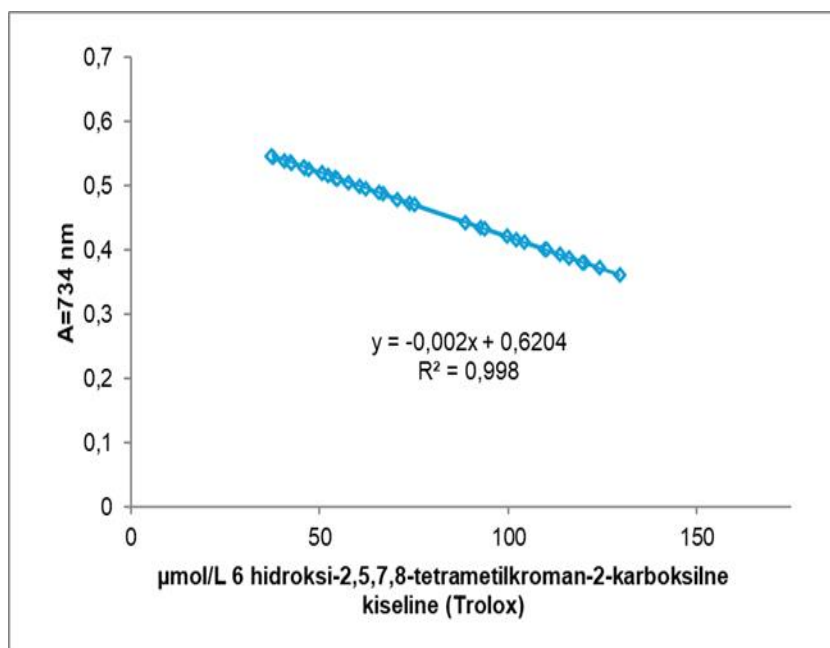
Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom temelji se na sposobnosti antioksidativnih spojeva da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS<sup>•+</sup>). U prisutnosti antioksidanasa stabilni ABTS<sup>•+</sup> kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Vrijednosti dobivene za apsorbanciju uzorka izmjerenih ABTS+ metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

Uzorci su prvo promiješani pomoću Vortex miješalice. Nakon toga je uzet određeni volumen uzorka i razrijeđen ekstrakcijskim otapalom 5 puta.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti, bilo je potrebno pomiješati 160  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka s 2 mL 1 %-tnog ABTS<sup>•+</sup> u staklenoj epruveti. Reakcijska smjesa odstajala je 1 min, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu upotrijebljen je 96 %-tni etanol. Za svaki uzorak pripremljene su 2 paralele kako bi dobili što precizniji rezultati.

Kao i u prethodnoj metodi, za određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva u kori banane, bilo je potrebno izraditi baždarni pravac na temelju antioksidacijske aktivnosti različitih koncentracija standardne otopine Troloxa. Potrebno je bilo pripremiti 0,02 mol/L otopinu Troloxa otapanjem 500 mg krutog Troloxa 100 %-tnim metanolom. Kruti Trolox izvagan je u plastičnoj lađici i prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL, pomoću malog staklenog lijevka, nakon čega je tikvica do oznake nadopunjena 100 %-tnim metanolom. Iz standardne otopine pripremljena su razrjeđenja da bi se dobile otopine slijedećih koncentracija: 25, 50, 100 i 200  $\mu\text{mol/L}$ . Otpipetirano je redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL standardne otopine u odmjerne tikvice koje su zatim do oznake nadopunjene 100 %-tnim metanolom. Iz pripremljenih razrjeđenja, uzima se po 160  $\mu\text{L}$  otopine te se pomiješa s 2 mL 1 %-tnog ABTS<sup>•+</sup>. Nakon 1 min stajanja smjese, mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 734 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac (slika 7) tako što se na apscisu nanese koncentracija otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 734 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijske aktivnosti uzorka.



**Slika 7.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

$$Y = -0,002X + 0,6204 \quad R^2 = 0,998 \quad [4]$$

Y – apsorbancija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine µM

R2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijska aktivnost izražena je u mmol TE/100 g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.7. OBRADA REZULTATA

Preciznost mjerenja apsorbancije osigurana je pripremom 2 paralelne reakcijske smjese za svaki od 27 uzoraka u sve 4 provedene analitičke metode. Za izradu baždarnih dijagrama i obradu sirovih rezultata korišten je program Microsoft Excel, a statistička analiza napravljena je u programu Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tusla SAD). Analizirana je normalnost i homoskedastičnost ostataka primjenom Shapiro-Wilk-ovog i Leveneovog testa te je na uzorcima koji su udovoljili navedenim uvjetima provedena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s Tukey testom za višestruko uspoređivanje rezultata, dok je na uzorcima koji nisu udovoljili uvjetima normalnosti i homoskedastičnosti proveden neparametrijski Kruskal-Wallis test s uspoređivanjem rangova. Nezavisne varijable bile su omjer uzorka i otapala, vrijeme ekstrakcije i temperatura ekstrakcije, dok su zavisne varijable bile maseni udio flavonoida i

hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijska aktivnost određena FRAP i ABTS metodom, uz razinu značajnosti  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu, ekstrahirani su fenolni spojevi iz kore banane (*Musa sp.*) primjenom MAE uz 30%-tnu vodenu otopinu etanola kao otapalo. Ispitivan je utjecaj omjera uzorka i otapala (1:40, 1:50 i 1:60 g/mL), vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) i temperature (40, 60 i 80 °C) na udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te na antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva u kori banane kako bi se utvrdili optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore banane i potencijal kore banane kao nusproizvoda za upotrebu u prehrambenoj industriji i industriji dodataka prehrani.

### 4.1.UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA MASENI UDIO UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I UKUPNIH FLAVONOIDA EKSTRAKTIMA KORE BANANE

Tablica 3 prikazuje vrijednosti masenih udjela THA i TF u ekstraktima kore banane nakon MAE, uz variranje omjera uzorka i otapala, temperature i vremena ekstrakcije.

Možemo vidjeti kako je minimalna vrijednost masenog udjela THA bila 64 mg ekvivalenata CGA/100 g uzorka, pri temperaturi 60 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Maksimalna vrijednost masenog udjela THA iznosila je  $172,95 \pm 1,21$  mg ekvivalenata CGA/100 g uzorka pri temperaturi od 80 °C, vremenu ekstrakcije 15 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Vidljivo je da je minimalni maseni udio ukupnih flavonoida nakon ekstrakcije iznosio  $18,40 \pm 1,64$  mg ekvivalenata QCT/100 g uzorka, pri temperaturi 60 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Maksimalni maseni udio iznosio je  $64,96 \pm 1,02$  mg ekvivalenata QCT/100 g uzorka, pri temperaturi 60 °C, vremenu ekstrakcije 15 min te omjeru uzorka i otapala 1:50 g/mL.

**Tablica 3.** Rezultati određivanja masenog udjela THA i TF u ekstraktima kore banane dobivenih primjenom MAE

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Udio THA (mg CGA/100 g uzorka)	Udio TF (mg QCT/100 g uzorka)
1	1:40	40	5	107,59 ± 6,46	36,09 ± 0,41
2			10	77,84 ± 11,30	29,99 ± 0,82
3			15	98,94 ± 5,65	31,72 ± 0,82
4		60	5	64,12 ± 0,00	18,40 ± 1,64
5			10	81,84 ± 4,04	19,86 ± 1,23
6			15	94,33 ± 0,81	21,29 ± 1,64
7		80	5	89,22 ± 0,00	29,98 ± 0,82
8			10	75,00 ± 2,42	32,31 ± 1,64
9			15	74,98 ± 2,42	25,07 ± 0,41
10	1:50	40	5	117,14 ± 3,00	32,55 ± 0,51
11			10	100,40 ± 3,01	30,83 ± 3,06
12			15	146,91 ± 1,00	35,43 ± 3,56
13		60	5	77,26 ± 2,02	20,10 ± 0,00
14			10	98,54 ± 2,01	27,30 ± 0,00
15			15	150,77 ± 7,06	64,96 ± 1,02
16		80	5	106,55 ± 1,01	39,65 ± 1,02
17			10	120,09 ± 1,00	44,08 ± 1,53
18			15	127,26 ± 2,02	32,78 ± 3,58
19	1:60	40	5	108,41 ± 2,43	39,42 ± 1,85
20			10	105,69 ± 1,21	30,67 ± 0,61
21			15	113,75 ± 0,00	42,53 ± 1,23
22		60	5	90,24 ± 1,21	27,62 ± 0,00
23			10	124,98 ± 10,94	45,17 ± 1,23
24			15	138,45 ± 1,21	40,73 ± 1,23
25		80	5	168,39 ± 2,43	61,58 ± 1,23
26			10	125,55 ± 2,43	38,11 ± 3,69
27			15	172,95 ± 1,21	63,86 ± 4,31

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

#### 4.1.1. Utjecaj parametara ekstrakcije na prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina

U tablici 4 prikazan je utjecaj omjera uzorka i otapala, temperature i vremena provođenja MAE na maseni udio THA. Iz rezultata statističke obrade možemo uočiti da je prosječna vrijednost THA, izraženih kao mg ekvivalenata CGA/100 g uzorka, iznosila 109,52; odnosno 1,0952 mg ekvivalenata CGA/g uzorka. Omjer uzorka i otapala pokazao se statistički značajnim čimbenikom ( $p \leq 0,05$ ), dok se temperatura i vrijeme ekstrakcije nisu pokazali značajnima kod povećanja prinosa THA ( $p > 0,05$ ).

**Tablica 4.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio THA u ekstraktima kore banane

Izvor varijacije	N	Udio THA (mg CGA/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		p < 0,01*
1:40	18	84,87 ± 3,26 <sup>a</sup>
1:50	18	116,10 ± 5,42 <sup>b</sup>
1:60	18	127,60 ± 6,45 <sup>b</sup>
Temperatura (°C)		p = 0,26
40	18	108,52 ± 4,28 <sup>a</sup>
60	18	102,28 ± 6,76 <sup>a</sup>
80	18	117,78 ± 8,24 <sup>a</sup>
Vrijeme (min)		p = 0,21
5	18	103,21 ± 6,81 <sup>a</sup>
10	18	101,10 ± 4,64 <sup>a</sup>
15	18	124,26 ± 7,20 <sup>a</sup>
Prosječna vrijednost	54	109,52

\*Statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Statistička analiza pokazala je da je povećanje omjera uzorka i otapala s 1:40 na 1:50 g/mL rezultiralo povećanjem prinosa THA, ali nije bilo značajnih povećanja prinosa u uvjetima u kojima je omjer uzorka i otapala 1:60 g/mL u odnosu na omjer 1:50 g/mL, što znači da je omjer uzorka i otapala 1:50 g/mL dovoljno učinkovit za ekstrakciju THA iz praha liofilizirane kore banane. Adekvatan omjer uzorka i otapala omogućit će homogeno i učinkovito zagrijavanje cijelog sustava, a povećanje omjera uzorka i otapala povećat će koncentracijski gradijent koji pokreće prijenos mase otopljenih fenola u ekstrakcijsko otapalo, što rezultira povećanim prinosom spojeva (Dahmoune i sur., 2014).

Povećanje temperature na kojoj se provodi ekstrakcija nije značajno utjecalo na povećanje prinosa THA u ovom radu. Shodno tome, moguće je zaključiti da je minimalna primijenjena temperatura, koja je iznosila 40 °C, dovoljno učinkovita za ekstrakciju THA, jer povišenjem temperature na 60 ili 80 °C neće doći do značajnog povećanja prinosa spojeva. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima Ćurko i sur. (2019), koji su utvrdili da povećanje temperature ekstrakcije s 30 na 45 i 60°C nije značajno utjecalo na povećanje prinosa THA ekstrahiranih iz komine kožice grožđa. Đurović i sur. (2018) promatrali su utjecaj MAE na profil fenolnih kiselina

u ekstraktu žutih sjemenki soje. Kada su varirali temperaturu MAE unutar vremenskog intervala od 2 min, zaključili su da se povećanjem temperature povećava sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima te da se radi o statistički značajnom parametru, što se razlikuje od rezultata ovog rada. Usvojili su temperaturu 85 °C kao optimalnu za ekstrakciju, što je veća temperatura od maksimalne temperature primijenjene u ovom radu za ostvarivanje maksimalnog masenog udjela THA , ali unutar kraćeg vremena.

Također, vrijeme ekstrakcije nije se pokazalo statistički značajnim čimbenikom za veći prinos THA u ovom radu pa je moguće zaključiti da je 5 min ekstrakcije dovoljno učinkovito za ekstrakciju pomoću MAE. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima Ćurko i sur. (2019), koji su ekstrahirali THA iz komine kožice grožđa tijekom 2, 9 i 16 min uz konstantnu temperaturu od 30, 45 ili 60 °C. Oni su utvrdili da produljenjem ekstrakcije pri konstantnoj temperaturi ne dolazi do značajnog povećanja prinosa THA. Nadalje, slično rezultatima ovog rada, Vergara-Salinas i sur. (2012) utvrdili su da se maksimalan prinos THA dobiva tijekom 5 min MAE u vodenom ekstraktu timijana te da se daljnjim produljenjem ekstrakcije smanjuje prinos.

#### 4.1.2. Utjecaj parametara ekstrakcije na prinos ukupnih flavonoida

U tablici 5 prikazan je i utjecaj omjera uzorka i otapala, temperature i vremena provođenja ekstrakcije mikrovalovima na maseni udio TF. Prosječna vrijednost TF, izraženih kao mg QCT/100 g uzorka iznosila je 35,63, odnosno 0,3563 mg QCT/g uzorka. Omjer uzorka i otapala pokazao se statistički značajnim čimbenikom ( $p \leq 0,05$ ), dok se temperatura i vrijeme ekstrakcije nisu pokazali značajnima kod povećanja prinosa ( $p > 0,05$ ).

**Tablica 5.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio TF u ekstraktima kore banane.

Izvor varijacije	N	Udio TF (mg QCT/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		$p < 0,01^*$
1:40	18	$27,19 \pm 1,44^a$
1:50	18	$36,41 \pm 2,93^{a,b}$
1:60	18	$43,30 \pm 2,84^b$
Temperatura (°C)		$p = 0,14$
40	18	$34,36 \pm 1,04^a$
60	18	$31,72 \pm 3,59^a$
80	18	$40,82 \pm 3,14^a$

**Tablica 5.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio TF u ekstraktima kore banane - *nastavak*

Vrijeme (min)		p = 0,51
5	18	33,93 ± 2,94 <sup>a</sup>
10	18	33,15 ± 1,87 <sup>a</sup>
15	18	39,82 ± 3,56 <sup>a</sup>
Prosječna vrijednost	54	35,63

\*Statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija

Anal i sur. (2014) ekstrahirali su flavonoide u kori zrele banane pomoću MAE i detektirali  $196,1 \pm 6,70$  mg ekvivalenata QCT/g uzorka, što je značajno veća vrijednost od prosječne vrijednosti flavonoida u ovom radu, što može biti rezultat razlika u metodologiji radova. Aboul – Enein i sur. (2016) identificirali su fenolne spojeve iz kore banane koristeći različita otapala za ekstrakciju. Kod upotrebe 80%-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala, maseni udio ukupnih flavonoida izraženih u ekvivalentima kvercetin iznosio im je  $18,52 \pm 0,06$  mg QCT/g suhe tvari, što je više od prosječne vrijednosti ukupnih flavonoida u ovom eksperimentalnom radu. Značajne razlike u rezultatima mogu se objasniti razlikama u upotrijebljenim uzorcima za ekstrakciju i metodologiji eksperimentalnih radova, uključujući razlike u tehnikama ekstrakcije i vrsti ekstrakcijskog otapala. Nadalje, Rebello i sur. (2014) ekstrahirali su flavonoide iz brašna kore banane pomoću ultrazvučne kupke, a detektirali su ih pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Maseni udio flavonoida iznosio je 0,129 mg ekvivalenata kvercetin-3-rutinozida/g uzorka u brašnu kore banane, što je manje od prosječne vrijednosti masenog udjela flavonoida u ovom radu. Razlike u rezultatima posljedica su primjene različitih tehnika ekstrakcije i kvantifikacije flavonoida te moguće toplinske degradacije flavonoida uslijed prerade kore banane u brašno. Suleria i sur. (2020) analizirali su sadržaj flavonoida u korama različitog voća te su detektirali  $1,32 \pm 0,12$  mg QCT/g uzorka kore banane sorte *Cavendish*, što je veće od prosječne vrijednosti flavonoida u ovom radu. Islam i sur. (2023) detektirali su ukupne flavonoide u ekstraktima kore banane dobivenima pomoću ekstrakcije enzimima, pri čemu su varirali temperaturu, vrijeme i omjer uzorka i otapala. Maksimalna vrijednost ukupnih flavonoida iznosila je oko 14 mg QCT/g uzorka, što je više od prosječne vrijednosti ukupnih flavonoida u ovom radu, a razlike proizlaze iz primijene različite tehnike za ekstrakciju spojeva.



Statistička analiza pokazala je da povećanje omjera uzorka i otapala s 1:40 na 1:60 g/mL rezultira značajnim povećanjem prinosa flavonoida, dok se uzorci u kojima je omjer uzorka i otapala bio 1:50 g/mL ne razlikuju značajno po prinosu flavonoida od uzoraka omjera 1:40 g/mL, kao ni od uzoraka omjera 1:60 g/mL. Islam i sur. (2023) utvrdili su da se povećanjem omjera uzorka i otapala kod enzimske ekstrakcije povećava i prinos ukupnih flavonoida. Kod omjera 1:25 g/mL dobili su maksimalne prinose flavonoida, što je niže od optimalnog omjera za ovaj rad, 1:60 g/mL. Povećanje omjera povećava prijenos mase između otapala i uzorka zbog veće dodirne površine pa se spojevi učinkovitije otapaju u otapalu, što rezultira boljim prinosom. Kod Islama i sur. (2023) povećanjem omjera na 1:30 g/mL došlo je do pada prinosa spojeva, što su objasnili iscrpljenošću otopljenog matriksa i koncentracijom flavonoida ispod razine topljivosti.

Difuzija otapala i ekstrakcijska kinetika poboljšavaju se kod povećanja temperature pa je i prinos spojeva veći (Osorio-Tobón, 2020). Međutim, povišenje temperature ekstrakcije nije značajno utjecalo na povećanje prinosa flavonoida u ovom radu pa se može zaključiti da je minimalna primijenjena temperatura, koja je iznosila 40 °C, dovoljno učinkovita za ekstrakciju jer povišenjem temperature ekstrakcije na 60 ili 80 °C nije došlo do značajnog povećanja prinosa spojeva. Suprotno tome, Ćurko i sur. (2019) utvrdili su da temperatura ekstrakcije značajno utječe na prinos ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz komine kože grožđa pomoću MAE. Oni su utvrdili da je 45 °C optimalna temperatura za ekstrakciju flavonoida, jer su prinosi flavonoida bili veći nego pri temperaturama 30 i 60 °C. Takva je temperatura tek nešto viša od minimalne temperature upotrijebljene u ovom radu (40 °C), koja se pokazala dovoljno učinkovita za ekstrakciju flavonoida. Anal i sur. (2014) utvrdili su da se povećanjem temperature ekstrakcije s 40 na 50 ili 60 °C, uz primjenu istog vremena ekstrakcije, povećava prinos fenolnih spojeva, od kojih su većina bili flavonoidi, u ekstraktu zrele kore banane, ali ne značajno. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima ovog rada da je temperatura MAE 40 °C dovoljna za učinkovitu ekstrakciju flavonoida iz kore banane. Islam i sur. (2023) koristili su raspon temperatura od 35 do 60 °C za ekstrakciju flavonoida enzimski. Iako su maksimalan prinos flavonoida dobili ekstrakcijom pri 45 °C, a iznosio je  $14,3 \pm 0,13$  mg QCT/g uzorka, ta se vrijednost nije značajno razlikovala od prinosa pri 40 °C. To je u skladu s rezultatima ovog rada, gdje također nije došlo do značajnog povećanja prinosa primjenom temperatura viših od 40 °C. Važno je pažljivo odabrati temperaturu ekstrakcije kako bi se spriječila oksidacija određenih fenolnih spojeva pri visokim temperaturama, iako više temperature mogu skratiti vrijeme potrebno za ekstrakciju spojeva.

Nadalje, Ćurko i sur. (2019) zaključili su da je vrijeme ekstrakcije statistički značajan parametar za ekstrakciju flavonoida iz komine kože grožđa, što se razlikuje od rezultata ovog rada. Oni su utvrdili da se najviše koncentracije flavonoida ekstrahiraju nakon 9 min MAE, dok

je produljenje na 16 min rezultiralo padom koncentracije ukupnih flavonoida, vjerojatno zbog oksidativne degradacije flavonoida s većim brojem hidroksilnih supstituenata na B prstenu koji su termolabilni. Iako je maksimalan prinos ekstrakcije flavonoida u ovom je radu ostvaren nakon 15 min ekstrakcije, vrijeme nije bilo statistički značajno za povećanje prinosa flavonoida pa je moguće zaključiti da je 5 min dovoljno vrijeme za učinkovitu ekstrakciju flavonoida, što je kraće od optimalnog vremena koje su utvrdili Ćurko i sur. (2019). Anal i sur. (2014) utvrdili su da se produljenjem MAE pri istoj temperaturi, precizno 40 °C, neće značajno povećati prinos ukupnih fenolnih spojeva u zreloj kori banane, među kojima dominiraju flavonoidi, što se podudara s rezultatima statističke analize ovog rada. Međutim, potrebno je naglasiti da je najkraća ekstrakcija kod Anala i sur. (2014) trajala 10 min, što je 2 puta duže od minimalnog vremena za MAE u ovom radu. Sáenz de Miera i sur. (2023) ekstrahirali su flavonoide iz kore naranče tijekom 1,5; 3 i 6 min. Utvrdili su da je 6 min optimalno vrijeme za ekstrakciju flavonoida iz kore naranče za ostvarivanje maksimalnih prinosa, uz 8 0%-tni etanol kao otapalo. Varijacije u optimalnom vremenu za ekstrakciju flavonoida uvjetovane su razlikama u dostupnosti spojeva ekstrakcijskom otapalu zbog različitosti biljnih materijala, prisutnosti flavonoida kao slobodnih spojeva ili kao kompleksa sa staničnom strukturom te zastupljenosti u obliku različitih derivata. Ipak, iz navedenih rezultata istraživanja može se zaključiti kako je vremenski interval od 5 do 10 min dovoljan za učinkovitu izolaciju flavonoida iz kore banane primjenom MAE.

## **4.2. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST EKSTRAKATA KORE BANANE**

Tablica 6 prikazuje utjecaj parametara MAE, omjera uzorka i otapala, temperature i vremena, na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP i ABTS metodama, u ekstraktima kore banane.

Vidljivo je da minimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom iznosila  $1,97 \pm 0,05$  mmol TE/100 g uzorka, pri temperaturi ekstrakcije 60 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru uzorka i otapala 1:40 g/mL. Maksimalna vrijednost iznosila je  $14,58 \pm 0,18$  mmol TE/100 g uzorka, pri temperaturi 80 °C, vremenu ekstrakcije 15 min i omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

Minimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom iznosila je  $3,21 \pm 0,06$  mmol TE/100 g uzorka, uz slijedeće parametre ekstrakcije: temperaturu od 60 °C, vrijeme ekstrakcije 5 min i omjer uzorka i otapala 1:40 g/mL. Maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom bila je  $9,12$  mmol TE/100 g uzorka pri temperaturi 80 °C, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru uzorka i otapala 1:60 g/mL.

**Tablica 6.** Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata kore banane određenog FRAP i ABTS metodama u ovisnosti o uvjetima MAE

Br. uzorka	Omjer uzorka i otapala (g/mL)	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (min)	FRAP (mmol TE/100 g)	ABTS (mmol TE/100 g)
1	1:40	40	5	4,94 ± 0,37	5,70 ± 0,03
2			10	5,25 ± 0,18	4,17 ± 0,01
3			15	5,58 ± 0,01	5,33 ± 0,02
4		60	5	1,97 ± 0,05	3,21 ± 0,06
5			10	3,35 ± 0,00	4,41 ± 0,13
6			15	5,81 ± 0,08	4,41 ± 0,13
7		80	5	5,39 ± 0,04	5,45 ± 0,02
8			10	8,98 ± 0,09	6,08 ± 0,03
9			15	3,56 ± 0,04	4,59 ± 0,03
10	1:50	40	5	3,73 ± 0,15	5,56 ± 0,09
11			10	3,94 ± 0,43	5,80 ± 0,18
12			15	5,06 ± 0,26	5,87 ± 0,04
13		60	5	3,51 ± 0,05	4,00 ± 0,01
14			10	6,20 ± 0,15	6,43 ± 0,00
15			15	8,62 ± 0,05	7,00 ± 0,01
16		80	5	8,95 ± 0,14	6,92 ± 0,07
17			10	8,31 ± 0,23	7,59 ± 0,04
18			15	4,87 ± 0,23	7,51 ± 0,04
19	1:60	40	5	5,09 ± 0,05	4,19 ± 0,01
20			10	5,20 ± 0,05	4,74 ± 0,01
21			15	5,82 ± 0,38	5,68 ± 0,18
22		60	5	6,27 ± 0,33	5,71 ± 0,04
23			10	6,75 ± 0,38	6,38 ± 0,27
24			15	13,51 ± 0,13	7,53 ± 0,09
25		80	5	14,58 ± 0,18	9,09 ± 0,03
26			10	12,49 ± 0,16	9,12 ± 0,00
27			15	9,19 ± 0,31	9,11 ± 0,01

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

#### 4.2.1. Utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom

U tablici 7 prikazan je utjecaj temperature, omjera uzorka i otapala te vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost kore. Prosječna vrijednost mjerena FRAP metodom iznosila je 6,55 mmol TE/100 g uzorka odnosno 65,5 μmol TE/g. Omjer uzorka i otapala te trajanje MAE nisu se pokazali statistički značajnim čimbenicima kod određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom ( $p > 0,05$ ), dok se temperatura pokazala statistički značajnim čimbenikom ( $p \leq$

0,05).

**Tablica 7.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima kore banane određenoj FRAP metodom

Izvor varijacije	N	FRAP (mmol TE/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		p = 0,06
1:40	18	4,98 ± 0,45 <sup>a</sup>
1:50	18	5,91 ± 0,50 <sup>a</sup>
1:60	18	8,77 ± 0,87 <sup>a</sup>
Temperatura (°C)		p < 0,01*
40	18	4,96 ± 0,16 <sup>a</sup>
60	18	6,22 ± 0,78 <sup>a,b</sup>
80	18	8,48 ± 0,81 <sup>b</sup>
Vrijeme (min)		p = 0,21
5	18	6,05 ± 0,86 <sup>a</sup>
10	18	6,72 ± 0,65 <sup>a</sup>
15	18	6,89 ± 0,70 <sup>a</sup>
Prosječna vrijednost	54	6.55

\*Statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Iako je povećanjem omjera uzorka i otapala došlo do povećanja antioksidacijske aktivnosti, to povećanje nije bilo statistički značajno pa zaključujemo da je omjer 1:40 g/mL optimalan za ostvarivanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, uz manju potrošnju otapala. Nedostatak statističke značajnosti omjera uzorka i otapala u ovom radu na antioksidacijsku aktivnost kod FRAP metode nije u skladu s rezultatima koje su dobili Vu i sur. (2019) za koru banane. Naime, oni su utvrdili da povećanjem omjera uzorka i otapala smanjuje antioksidacijska aktivnost uzoraka kore banane pa je omjer uzorka i otapala naveden kao statistički značajan parametar. Suprotno tome, rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima Dailey i Vuong (2015) koji su mjerili antioksidacijsku aktivnost kožice makadamija oraha i zaključili da omjer uzorka i otapala nije statistički značajan parametar za antioksidacijsku aktivnost kod MAE.

Povećanje temperature za ekstrakciju rezultiralo je povećanjem antioksidacijske aktivnosti. Primijećena je statistički značajna razlika u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti između grupa uzoraka čija je ekstrakcija provedena pri 40 °C i grupa uzoraka čija je ekstrakcija provedena pri 80 °C ukazujući na to da tek značajniji porast temperature ima učinka na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Međutim, grupa uzoraka čija je MAE provedena pri 60 °C ne razlikuje se značajno po vrijednostima antioksidacijske aktivnosti od vrijednosti dobivenih nakon ekstrakcije pri 40 i 80 °C, stoga se ona može uzeti kao optimalna zbog manje potrošnje energije u odnosu na 80 °C. Gómez-Cruz i sur. (2022) pratili su utjecaj parametara MAE na antioksidacijsku aktivnost uzoraka komine masline. Koristili su temperaturni raspon od 40 do 100 °C, a maksimalnu antioksidacijsku aktivnost dobili su ekstrakcijom pri 70 °C, što je koja se nalazi između vrijednosti od 60 i 80 °C koje su se u ovom radu pokazale statistički jednakima te se kao takva slaže s rezultatima ovog rada. Iako se u ovom eksperimentalnom radu vrijeme nije pokazalo statistički značajnim parametrom, valja reći da je maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti nakon provođenja FRAP metode dobivena za uzorak koji se ekstrahirao 5 min. Vu i sur. (2019) utvrdili su da je 6 minuta optimalno vrijeme ekstrakcije za ostvarivanje maksimalne aktivnosti mjerene pomoću FRAP metode. Shodno navedenim rezultatima, moguće je zaključiti da MAE u periodu od 5 do 6 min rezultira maksimalnom antioksidacijskom aktivnošću mjenom FRAP metodom.

#### 4.2.2. Utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom

Tablica 8 prikazuje utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom. Prosječna antioksidacijska aktivnost iznosila je 5,98 mmol TE/100 g, odnosno 59,8 µmol TE/g uzorka. Omjer uzorka i otapala te temperatura ekstrakcije pokazali su se statistički značajnim parametrima ( $p \leq 0,05$ ), dok vrijeme nije bilo statistički značajan parametar ( $p > 0,05$ )

**Tablica 8.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima kore banane određenoj ABTS metodom

Izvor varijacije	N	ABTS (mmol TE/100 g)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)		$p < 0,01^*$
1:40	18	$4,82 \pm 0,20^a$
1:50	18	$6,30 \pm 0,26^b$
1:60	18	$6,84 \pm 0,44^b$

**Tablica 8.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima kore banane određenoj ABTS metodom – *nastavak*

Temperatura (°C)		p < 0,01*
40	18	5,23 ± 0,16 <sup>a</sup>
60	18	5,45 ± 0,34 <sup>a</sup>
80	18	7,27 ± 0,38 <sup>b</sup>
Vrijeme (min)		p = 0,07
5	18	5,54 ± 0,40 <sup>a</sup>
10	18	6,08 ± 0,36 <sup>a</sup>
15	18	6,33 ± 0,36 <sup>a</sup>
Prosječna vrijednost	54	5,98

\*Statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod p ≤ 0,05. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti kore banane mjerene ABTS metodom manja je od prosječne antioksidacijske aktivnosti kore marakuje koja je iznosila oko 155 μmol TE/g uzorka prema istraživanju Vo i sur. (2023) te prosječne antioksidacijske aktivnosti kore limete koja je iznosila 444 μmol TE/g prema istraživanju Roodsamran i Sothornvit (2019).

Povećanjem omjera uzorka i otapala s 1:40 na 1:50 g/mL, došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti nakon MAE u ovom radu, a daljnjim povećanjem omjera na 1:60 g/mL nije došlo do značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti. Na temelju toga zaključujemo da je omjer 1:50 g/mL optimalan za dobivanje maksimalnih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Statističku značajnost omjera uzorka i otapala na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom potvrdili su Dailey i Vuong (2015). Oni su proučavali utjecaj uvjeta MAE na antioksidacijsku aktivnost otpada kožice makadamija oraha te su zaključili da se povećanjem omjera uzorka i otapala smanjila antioksidacijska aktivnost ekstrakta kore makadamija oraha, što nije u skladu s opažanjima u ovom radu. Razlike u rezultatima mogu se objasniti razlikama u sastavu fenolnih spojeva u kori banane i kožici oraha koji ispoljavaju antioksidacijsku aktivnost te primjenom različitih ekstrakcijskih otapala.

Također, povećanje temperature ekstrakcije sa 60 na 80 °C rezultiralo je značajnijim povećanjem antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom pa možemo zaključiti da će MAE ispoljiti maksimalne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pri temperaturi 80 °C. Islam i sur. (2023) potvrdili su da je promjena temperature statistički značajna kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom. Oni su pokazali da povećanje temperature od 35 do 45 °C dovodi do povećanja antioksidacijske aktivnosti hvatanja ABTS radikala kod ekstrakta

kore banane dobivenih enzimskom metodom, što je u skladu s povećanjem prinosa flavonoida do temperature 40 °C . Nakon primijenih temperatura  $\geq 50$  °C nije došlo do daljnjeg povećanja antioksidacijske aktivnosti. Maksimalna aktivnost ostvarena je pri temperaturi 45 °C, što je značajno niža temperatura od utvrđene optimalne temperature za ostvarivanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti u ovom radu, a razlike mogu biti posljedica razlika u sastavu materijala podvrgnutih ekstrakciji.

Produljenje vremena ekstrakcije nije rezultiralo povećanjem antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, što ukazuje na to da je 5 min ekstrakcije dovoljno za dobivanje zadovoljavajućih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene ovom metodom, što je blisko rezultatima Weremfa i sur. (2020), koji su utvrdili da je vrijeme MAE značajno utjecalo na antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom u sjemenkama avokada kada je primijenjen raspon 1-5 min, a optimalno vrijeme MAE za ostvarivanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti iznosilo je 4,8 min.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Kora banane sadrži značajne koncentracije hidroksicimetnih kiselina i flavonoida te posjeduje antioksidacijsku aktivnost, što omogućuje njezinu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji u svrhu poboljšanja finalnih proizvoda.
2. Prosječna vrijednost THA ekstrahiranih iz kore banane pomoću MAE iznosila je 109,52 mg CGA/100 g uzorka, a prosječna vrijednost ekstrahiranih TF iznosila je 35,63 mg QCT/100 g uzorka. Prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom bila je 6,55 mmol TE/100 g , dok je za ABTS metodu iznosila 5,98 mmol TE/100 g.
3. Omjer uzorka i otapala pokazao se jedinim statistički značajnim parametrom za prinos THA i TF prilikom MAE te je povećanje omjera do 1:50 g/mL rezultiralo povećanjem prinosa ekstrakcije.
4. Kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, jedino se temperatura ekstrakcije pokazala statistički značajnim parametrom, dok je u slučaju mjerenja ABTS metodom, uz temperaturu bio značajan i omjer uzorka i otapala.
5. Utvrđeni optimalni parametri za ekstrakciju THA i TF primjenom MAE su temperatura ekstrakcije 40 °C i vrijeme ekstrakcije 5 min uz omjer otapala i uzorka 1:50 g/mL.
6. Optimalno vrijeme ekstrakcije za postizanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti bilo je 5 min uz omjer uzorka i otapala 1:40 g/mL i temperaturu ekstrakcije 60 °C u slučaju FRAP metode te omjer uzorka i otapala 1:50 g/mL i temperaturu 80 °C u slučaju ABTS metode.
7. Prinosi THA i TF te antioksidacijska aktivnost ekstrakta kore banane u ovom radu pokazala se nižom od dostupnih podataka u literaturi.



## 6. LITERATURA

Aboul-Enein A, Salama Z, Gaafar A, Aly HH (2016) Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradaisica* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *J Chem Pharm Res* **8**, 46-55.

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* **4**, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Alshehry GA (2023) Medicinal Applications of Banana Peel Flour Used as a Substitute for Computing Dietary Fiber for Wheat Flour in the Biscuit Industry. *Appl Bionics Biomech* 2023. <https://doi.org/10.1155/2022/2973153>

Anal AK, Jaisanti S, Noomhorm A (2014) Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata* Colla AAA) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. *J Food Sci Technol* **51**, 2632-2639. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0793-x>

Ansari N, Ramly N, Faujan NH, Arifin N (2023) Nutritional Content and Bioactive Compounds of Banana Peel and Its Potential Utilization: A Review. *Malaysian J of Sci H and Tech* **9**, 74-86. <https://doi.org/10.33102/mjosht.v9i1.313>

Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B (2017) Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother* **93**, 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.010>.

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Cavalloro V, Martino E, Linciano P, Collina S (2021) Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices. U: Churyumov G (ured.) *Microwave Heating - Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects*, Intech Open, London, 35 – 56.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 178-182.

Ćurko N, Kelšin K, Dragović- Uzelac V, Valinger D, Tomašević M, Kovačević Granić K (2019) Microwave-assisted extraction of different groups of phenolic compounds from grape skin pomaces: modeling and optimization. *Pol J Food Nutr Sci* **69**, 235 – 246. <https://doi.org/10.31883/pjfns/109423>

Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem* **166**, 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>

Dailey A, Vuong QV (2016) Optimum Conditions for Microwave Assisted Extraction for Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity from Macadamia (*Macadamia tetraphylla*) Skin Waste Using Water. *Processes* **4**, 2. <https://doi.org/10.3390/pr4010002>

Devatkal SK, Kumboj R, Paul D (2014) Comparative antioxidant effect of BHT and water extracts of banana and sapodilla peels in raw poultry meat. *J Food Sci Technol* **51**, 387–391. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0508-8>

DHAC (2023) The Biology of Musa L. (Banana). DHAC – Department of Health and Aged Health, <https://www.ogtr.gov.au/resources/publications/biology-musa-l-banana>.  
Pristupljeno 22. kolovoza 2024.

Dobroslavić E, Elez Garofulić I, Ilich JZ (2023) Potential of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaf Polyphenols for Modulation of Body Composition. *Appl Sci* **13**, 2275. <https://doi.org/10.3390/app13042275>

Đurović S, Nikolić B, Luković N, Jovanović J, Stefanović A, Šekuljica N, Mijin D, Knežević-Jugović Z (2018) The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds, *Ind Crop Prod*, **122**, 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.078>.

Gómez-Cruz I, Cara C, Romero I, Castro E, Gullón B (2020) Valorisation of Exhausted Olive

Pomace by an Eco-Friendly Solvent Extraction Process of Natural Antioxidants. *Antioxidants* **9**, 1010. <https://doi.org/10.3390/antiox9101010>

Gregory L, Yoshihara E, Ribeiro BLM, Silva LFK, Marques EC, Meira Jr EBS (2015) Dried, ground banana plant leaves (*Musa* spp.) for the control of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. *Parasitol Res* **114**, 4545–4551. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4700-z>

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Heba SM (2021) Banana plant as a source of valuable antimicrobial compounds and its current applications in the food sector. *J Food Sci* **86**. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15854>

Hikal WM, Said-Al Ahi HAH, Bratovcic A, Tkachenko KG, Sharifi-Rad J, Kačániová M i sur. (2022) Banana Peels: A Waste Treasure for Human Being. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022: 7616452. <https://doi.org/10.1155/2022/7616452>

Islam R, Kamal Md M, Kabir R, Hasan Md, Haque AR, Hasan SMK (2023) Phenolic compounds and antioxidants activity of banana peel extracts: Testing and optimization of enzyme-assisted conditions. *Measurement: Food* **10**, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.meafoo.2023.100085>

Lama-Muñoz A, Contreras MDM (2022) Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A Review. *Foods* **11**, 3671. <https://doi.org/10.3390/foods11223671>

Liu W, Feng Y, Yu S, Fan Z, Li X, Li J i sur. (2021) The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *Int J Mol Sci* **22**, 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>

Mishra Y, Amin HIM, Mishra V, Vyas M, Prabhakar PK, Gupta M i sur. (2022) Application of nanotechnology to herbal antioxidants as improved phytomedicine: An expanding horizon. *Biomed Pharmacother* **153**, 113413. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.11341>

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

Osorio-Tobón JF (2020) Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J Food Sci Technol* **57**, 4299-4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>

Padam BS, Tin HS, Chye FY, Abdullah MI (2014) Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J Food Sci Technol* **51**, 3527-3545. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0861-2>

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

Pratyusha Sambangi (2022) Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense: An Overview. <http://doi.org/10.5772/intechopen.102873>

Qamar S, Shaikh A (2018) Therapeutic potentials and compositional changes of valuable compounds from banana- A review. *Trends Food Sci Technol* **79**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.016>.

Rahmani S, Naraki K, Roohbakhsh A, Hayes AW, Karimi G (2022) The protective effects of rutin on the liver, kidneys, and heart by counteracting organ toxicity caused by synthetic and natural compounds. *Food Sci Nutr* **11**, 39–56. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3041>

Rebello L, Ramos A, Pertuzatti P, Barcia M, Castillo-Munoz, Herмосín-Gutiérrez I (2014) Flour of banana (Musa AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Res Int* **55**, 397-403. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.039>.

Rodsamran P, Sothornvit R (2019) Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Biosci* **28**, 66 – 73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>

Sáenz de Miera B, Cañadas R, González-Miquel M, González EJ (2023) Recovery of Phenolic Compounds from Orange Peel Waste by Conventional and Assisted Extraction

Techniques Using Sustainable Solvents. *Front Biosci (Elite Ed)* **15**, 30. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1504030>

Shi L, Zhao W, Yang Z, Subbiah V, Suleria HAR (2022) Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ Sci Pollut Res Int* **29**, 81112-81129. <http://doi:10.1007/s11356-022-23337-6>

Sidhu J, Zafar T (2018) Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Qual Saf* **2**, 183-188. <http://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy019>

Suleria HAR, Barrow CJ, Dunshea FR (2020) Screening and Characterization of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Capacity in Different Fruit Peels. *Foods* **9**, 1206. <https://doi.org/10.3390/foods9091206>

Tree Plantation (2024) Banana Trees: The Overlooked Powerhouse of Sustainable Living, <https://treeplantation.com/banana-trees.html>. Pristupljeno 23. kolovoza 2024.

Vergara-Salinas JR, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Agosin E, Pérez-Correa JR (2012) Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *J Agric Food Chem* **60**, 10920–10929. <https://doi.org/10.1021/jf3027759>

Vo TP, Nguyen NTU, Le VH, Phan TH, Nguyen THY, Nguyen DQ (2023) Optimizing Ultrasonic-Assisted and Microwave-Assisted Extraction Processes to Recover Phenolics and Flavonoids from Passion Fruit Peels. *ASC Omega* **8**, 33870–33882. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04550>

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2019) Maximising recovery of phenolic compounds and antioxidant properties from banana peel using microwave assisted extraction and water. *J Food Sci Technol* **56**, 1360–1370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03610-2>

Weremfo A, Adulley F, Adarkwah-Yiadom M (2020) Simultaneous Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) Seeds Using Response Surface Methodology. *J Anal Chem* **3**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/7541927>

Zaini H, Roslan J, Saallah S, Munsu E, Sulaiman N, Pindi W (2022) Banana peels as a bioactive ingredient and its potential application in the food industry. *J Funct Foods* **92**, 105054. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105054>

Zou F, Tan C, Zhang B, Wu W, Shang N (2022) The Valorization of Banana By-Products: Nutritional Composition, Bioactivities, Applications, and Future Development. *Foods* **11**, 3170. <https://doi.org/10.3390/foods11203170>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis