

# Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz začinske paprike primjenom predtretmana pulsirajućega električnoga polja

---

Šimunović, Anamaria

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:159:724949>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Anamaria Šimunović

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH  
KOMPONENTI IZ ZAČINSKE PAPRIKE  
PRIMJENOM PREDTRETMANA  
PULSIRAJUĆEGA ELEKTRIČNOGA POLJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno - prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tomislave Vukušić Pavičić, te uz pomoć dr. sc. Višnje Stulić i dr.sc. Mie Ivanov.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv.prof.dr.sc Tomislavi Vukušić Pavičić na njenom veselom duhu, prijateljskom, a ujedno i profesionalnom stavu te svim stručnim i korisnim savjetima kojima mi je ovaj put učinila zanimljivim i izuzetno korisnim.*

*Također se zahvaljujem dr.sc. Višnji Stulić na pomoći i toplim savjetima, kao i dr.sc. Miji Ivanov. Ova zahvala ne bi mogla proći bez dr.sc. Tomislave Grgić kojoj se zahvaljujem na neizmjernom strpljenju.*

*Hvala mojim roditeljima i obitelji koji su uvijek tu za mene, bez vas ne bih bila tu.*

*Hvala mojim prijateljima; s kojima dijelim put u Zagrebu, Mostaru, Osijeku i Splitu, hvala što ste obilježili moj dio života na najbolji mogući način.*

*Hvala mojem dečku Josipu za svaku podršku i zagrljaj, saslušanu riječ, smijeh i suzu.*

*Uistinu sam blagoslovljena.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

### EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ ZAČINSKE PAPRIKE PRIMJENOM PREDTRETMANA PULSIRAJUĆEGA ELEKTRIČNOGA POLJA

Anamaria Šimunović, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058222757

**Sažetak:** Cilj istraživanja bio je ispitati primjenu pulsirajućeg električnog polja kao predtretmana za izolaciju bioaktivnih tvari iz različitih vrsta paprika (slatka, ljuta, kajenska) uz analizu fenolnih spojeva, kapsaicinoida, antioksidativne aktivnosti te fizikalno – kemijskih svojstava. Dizajniran je eksperiment s 15 mogućih kombinacija. Uzorci su tretirani pri jakosti polja 2,0, 5,0 i 7,5 kV/cm uz vrijeme tretiranja 1, 3 i 5 minuta. Postupak pulsirajućeg električnog polja kao predtretman pokazao se pogodnim za dodatnu izolaciju bioaktivnih komponenti, povećavajući maseni udio fenola, prilikom čega je uzorak slatke paprike tretiran s električnim poljem jakosti 5 kV/cm tijekom jedne minute imao najveći prinos fenola u iznosu od 4,67 mg/g dok najvišu antioksidativnu aktivnost ima uzorak slatke paprike tretiran s 2,0 kV/cm tijekom tri minute u iznosu od 97,52 %.

**Ključne riječi:** paprika, pulsirajuće električno polje, kapsaicinoidi, fenoli.

**Rad sadrži:** 48 stranica, 15 slika, 21 tablica, 69 literaturnih navoda, 0 priloga

**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. Tomislava Vukušić Pavičić

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Višnja Stulić, dr.sc. Mia Ivanov

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Zoran Herceg (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Marija Badanjak Sabolović (zamjenski član)

**Datum obrane:** 30., rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Food Processes Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PEPPER USING THE PULSING ELECTRIC FIELD PRE-TREATMENT

Anamaria Šimunović, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058222757

**Abstract:** This research aimed to examine the application of pulsed electric fields as a pretreatment for isolating bioactive compounds from different types of peppers (sweet, hot, cayenne) with an analysis of phenolic compounds, capsaicinoids, antioxidant activity, and physical-chemical properties. An experiment with 15 possible combinations was designed. The samples were treated with 2,0, 5,0 and 7,5 kV/cm field strengths for 1, 3, and 5 minutes. The pulsed electric field process as a pretreatment proved to be suitable for the enhanced extraction of bioactive components, increasing the mass fraction of phenols, with the sample of sweet pepper treated with an electric field strength of 5 kV/cm for one minute having the highest phenol content of 4.67 mg/g. In comparison, the highest antioxidant activity was observed in the sweet pepper sample treated with 2.0 kV/cm for three minutes at 97.52 %.

**Keywords:** pepper, pulsed electric field, capsaicinoids, phenolic compounds.

**Thesis contains:** 48 pages, 15 figures, 21 tables, 69 references, 0 supplements

**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:** Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Višnja Stulić, PhD, Mia Ivanov, PhD

#### Reviewers:

1. Zoran, Herceg, PhD, Full professor (president)
2. Tomislava, Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Klara, Kraljić, PhD, Associate professor (member)
4. Marija, Badnjak Sabolović, PhD, Associate professor (substitutue)

**Thesis defended:** September 30<sup>th</sup>, 2024.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. PAPRIKA .....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PAPRIKE .....	3
2.3. BIOAKTIVNE KOMPONENTE PAPRIKE .....	5
2.3.1. Fenoli i flavonoidi .....	5
2.3.2. Kapsaicin i dihidrokapsaicin .....	7
2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....	9
2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA.....	9
2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija .....	10
2.4.2. Pulsirajuće električno polje.....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.2. Laboratorijska oprema .....	13
3.1.3. Kemikalije.....	14
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija u metanolu .....	14
3.2.2. Predtretman pulsirajućim električnim poljem.....	15
3.2.3. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava tretiranih uzoraka .....	16
3.2.4. Određivanje ukupnih fenola .....	17
3.2.5. Određivanje antioksidativnog statusa paprike primjenom DPPH metode .....	20
3.2.6. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	22
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. ANALIZA UZORAKA NAKON ULTRAZVUČNIH TRETMANA.....	26
4.1.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola u ultrazvučnim ekstraktima .....	26
4.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta paprike DPPH metodom nakon ultrazvučne ekstrakcije.....	27
4.1.3. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	29
4.2. ANALIZA UZORAKA NAKON PREDTRETMANA PEP-OM .....	30



4.2.3. Određivanje udjela fenola nakon tretiranja PEP-om .....	34
4.2.5. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem HPLC-UV metodom.....	38
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>43</b>

## 1. UVOD

Paprika (*Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense* i *C. pubescens*) predstavlja jednu od vodećih i ekonomski bitnih povrtnih kultura unutar Europe (Heidmann i Boutilier, 2015). Zbog svojih različitih aroma i boja nezaobilazna je namirnica u svakodnevnoj prehrani velikog broja kućanstava. Paprika je jednogodišnja zeljasta biljka roda *Capsicum* iz obitelji *Solanaceae* koja najbolje uspijeva unutar područja umjerene i tople klime (Lee i sur., 2017). Na rast paprike utjecaj mogu imati različiti čimbenici – vlažnost tla, dostupnost hranjivih tvari, fluktuacije temperature i napad patogena (Baker i sur., 2020). Osim različitih aroma i boja, odlikuje se brojnim nutrijentima, uključujući vitamin C, flavonoide, karotenoide i kapsaicinoide. Flavonoidi su fitokemikalije prisutne u zelenim, slatkim i ljutim plodovima (Bae i sur., 2012). Količina fitokemikalija u paprici varira ovisno o sorti, stupnju zrelosti, uvjetima uzgoja i postupcima nakon berbe. Važno je napomenuti da su ovi spojevi poznati po svojoj izrazito visokoj antioksidativnoj aktivnosti i pogodnim učincima na ljudsko zdravlje (Babanovska - Milenkovska i sur., 2016). Crvena paprika se ističe kao začim s najvećim antioksidativnim kapacitetom u usporedbi s ostalim začimima (Sim i Sil, 2008).

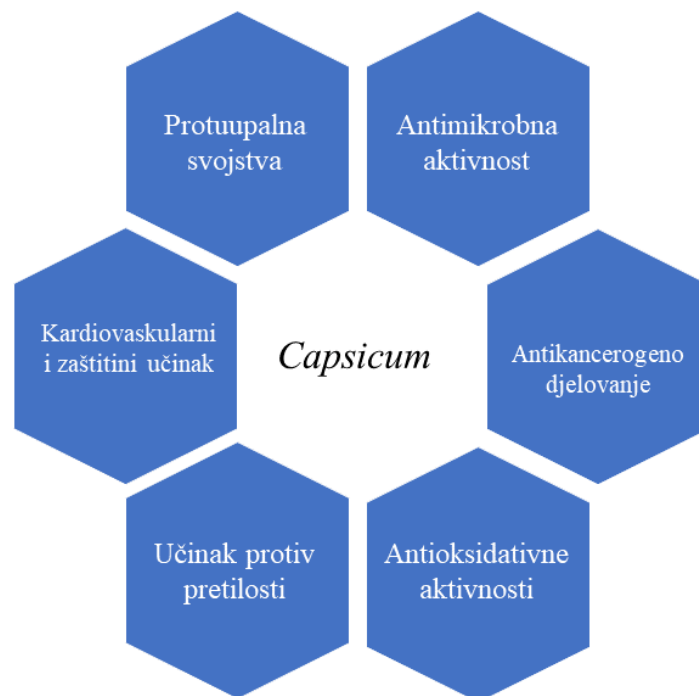
Kapsaicin predstavlja aktivnu komponentu paprike od koje proizlazi ljutina. Nalazi se u tkivu posteljice (koja sadrži sjemenke), unutarnjim membranama, te u manjoj koncentraciji u drugim mesnatim dijelovima plodova biljaka *Capsicum*. Kapsaicinoidi mogu imati potencijalnu kliničku vrijednost za ublažavanje boli, prevenciju raka i mršavljenje (Srinivasan, 2016). Udio masti u plodu paprike predstavlja vrlo važan parametar kvalitete jer ima važnu funkciju pri otapanju spojeva boje epikarpa te pridonosi intenzitetu crvene boje osušenih proizvoda i mljevenog praha (Zaki i sur., 2013).

Cilj ovoga rada bio je ispitati mogućnost primjene predtretmana pulsirajućim električnim poljem za izolaciju bioaktivnih tvari iz različitih vrsta paprike. Provedene su metode karakterizacije dobivenih ekstrakata praćenjem koncentracije fenolnih spojeva, prisutnosti kapsaicina i dihidroksikapsaicina, te antioksidativne aktivnosti.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PAPRIKA

Paprika predstavlja vrlo važan izvor nutrijenata za ljudsku prehranu s obzirom na udio vitamina A i C, neutralnih i kiselih fenolnih spojeva koji se deklariraju kao značajni antioksidativni spojevi koji sudjeluju u mehanizmima obrane od oksidacijskog stresa (slika 1) (Jeong i sur., 2023). Prema Darbieovom istraživanju iz 2005. godine, sve paprike koje su ekonomski važne pripadaju vrsti *Capsicum annum* L. Ova vrsta uključuje veliki broj sorti, uključujući i slatke i ljute. Različite sorte ponekad zahtijevaju specifične tehnike uzgoja i poljoprivredne tehnike tijekom razdoblja vegetacije (Palma M. i sur., 2020). Organoleptička svojstva paprike, veličina, boja i oblik mogu značajno ovisiti o vrsti same paprike pa tako zreli plodovi mogu imati različiti spektar boja – od bijele do žarko crvene (Wang i sur., 2023).



**Slika 1.** Učinci djelovanja paprike (prema Batiha i sur., 2020)

Kao bitna svojstva za odabir sorte paprike za uzgoj i obradu biraju se intenzitet crvene boje i stupanj ljutine (Arimboor i sur., 2015). S medicinskog stajališta, najvažniji spojevi u paprici su oni koji posjeduju antioksidativna svojstva, kao što su askorbinska kiselina i  $\beta$ -karoten, koji se unutar paprike nalaze u visokim koncentracijama. Štoviše,  $\beta$ -karoten je identificiran kao potencijalno antikancerogen spoj (Babanovska - Milenkovska i sur., 2016). Vrsta *Capsicum annum* svoju intenzivnu crvenu boju dobiva zbog karotenoidnih pigmenata koji nastaju tijekom zrenja plodova. Karotenoidi koji imaju glavnu ulogu u nastanku crvene boje su kapsantin, kapsorubin te kapsantin 5,6-epoksid, koji je prisutan samo unutar roda *Capsicum*

(Guil – Guerro i sur., 2006). Ljutinu paprici daju funkcionalne skupine alkaloidnih komponenti, poznati kao kapsaicinoidi (CAPS) koji se formiraju u plodu (Batiha i sur., 2020).

Udio masti u paprici predstavlja važan čimbenik u procjeni kvalitete, budući da ima ključnu ulogu u ekstrakciji pigmentnih spojeva iz površinskog sloja ploda, što rezultira karakterističnom crvenom bojom sušenih proizvoda i mljevenog praha. Osim estetskog aspekta, veća koncentracija masti čini začim homogenijim i privlačnijim. Važno je napomenuti da masne kiseline prisutne u plodu paprike također mogu akumulirati i u perikarpu (mesu) i sjemenu (Zaki i sur., 2013).

Ulja sjemenki paprike također su prisutna na tržištu, a sama vrijednost ulja ili masti temelji se na dva ključna aspekata: nutritivna kvaliteta i tehnička korist. Oba aspekta ovise o sastavu masnih kiselina i prisutnosti dodatnih sastojaka, kao što su aktivni spojevi vitamina E i fitosteroli. U kontekstu nutritivne vrijednosti, poželjno je da ulje sadrži nisku razinu zasićenih masnih kiselina, visok udio mononezasićenih masnih kiselina i uravnoteženi omjer između  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina. Također, visok sadržaj vitamina E, fitosterola i ostalih sekundarnih metabolita s bioaktivnim djelovanjem dodatno poboljšavaju nutritivni profil ulja. Osim što su korisni za zdravlje, navedene karakteristike također mogu pružiti tehničke prednosti, kao što su bolja stabilnost i produžena trajnost proizvoda koji sadrže ta ulja (Cocan i sur., 2021).

## **2.2. KEMIJSKI SASTAV PAPRIKE**

Paprika se odlikuje visokom nutritivnom i biološkom vrijednošću. Bogata je ugljikohidratima, biljnim vlaknima, uljima, organskim kiselinama, mineralima, vitaminima, pigmentima, kapsaicinom i eteričnim uljima (Dippong i sur., 2023). Vitamini su izuzetno važan sastojak u paprici s obzirom na to da nose visoku fiziološku vrijednost u ljudskoj prehrani. Sadržajem vitamina, paprika se ističe i nadmašuje mnoge druge vrste povrća, a ponekad čak i voća. Važno je napomenuti da su vitamini osjetljivi na razgradnju tijekom prerade paprike. Prilikom izloženosti kisiku iz zraka može doći do oksidacije vitamina, među kojima su askorbinska kiselina (vitamin C), kalciferol (vitamin D), retinol (vitamin A) i  $\beta$ -karoten (vitamin A). Askorbinska kiselina predstavlja glavni oblik vitamina C, te je najzastupljeniji vitamin u paprici, a njezin se sadržaj povećava sa zrelošću paprike (Chavez-Mendoza, 2015).

Paprika sadrži visok udio vode (82-92%). Tijekom samih početaka formiranja ploda udio šećera iznosi otprilike 20 % (suha tvar), dok u zreloj fazi doseže maksimum od 40 %. Oko 90-98 % ukupnog šećera u plodu paprike čini glukoza, dok je ostatak saharoza.

Prema podacima iz izvještaja FAO (Food and Agriculture Organization) iz 2009. godine, utvrđen je sljedeći kemijski sastav sušenih paprika (*Capsicum annum*):

- Proteini čine 12,8 % ukupne mase sušenih paprika
- Masti čine 11,9 % ukupne mase sušenih paprika
- Ugljikohidrati čine 56,2 % ukupne mase sušenih paprika
- Vlakna čine 22,5 % ukupne mase sušenih paprika

Slični rezultati dobiveni su u radu u kojem su Zaki i sur. (2013) analizirali svojstva marokanske slatke paprike. Prema Zaki i suradnicima paprika u prahu ima otprilike isti udio ugljikohidrata (oko 55%) i manji udio masti (oko 8%) u usporedbi s drugim podacima, ali značajno više vlakana (oko 36%) i proteina (oko 21%) (Zaki i sur., 2013) (tablica 1).

**Tablica 1.** Kemijska i nutritivna vrijednost paprike (prema Zaki i sur., 2013)

<i>Parametri</i>	<i>Rujan</i>	<i>Listopad</i>	<i>Studeni</i>	<i>Prosinac</i>
<i>Ugljikohidrati (g/100 s.t.)</i>	53,50 ± 4,8	55,96 ± 3,3	54,49 ± 5,3	55,33 ± 4,8
<i>Proteini (g/100 g s.t.)</i>	20,90 ± 2,1	20,19 ± 2,6	21,50 ± 4,5	20,28 ± 2,6
<i>Lipidi (g/100 g s.t.)</i>	8,28 ± 0,6	7,91 ± 2,6	7,55 ± 3,9	9,75 ± 3,3
<i>Dijetalna vlakna (g/100 g s.t.)</i>	35,05 ± 1,4	36,35 ± 7,7	37,07 ± 3	36,84 ± 3,7
<i>Ukupni šećeri (g/100 g s.t.)</i>	6,88 ± 0,47	9,47 ± 0,21	11,19±0,11	7,73 ± 0,41
<i>Energijski sadržaj (kJ)</i>	1449,55	1512,32	1497,64	1573,17
<i>Vitamin C (mg/100 g)</i>	1360.2±14,3	1830,2±39,4	1680,3±6,6	2020±32,3
<i>Ukupni sadržaj kapsaicina (mg/kg s.t.)</i>	48,4 ± 5,7	33,1 ± 3,8	59,7 ± 6,2	24,8 ± 5,5
<i>Scovillova ljestvica ljutine</i>	73	535	938	398
<i>Kalij (mg/100 g s.t.)</i>	2528 ± 909	2168 ± 147	2332 ± 364	2523 ± 280
<i>Fosfor (mg/100 g s.t.)</i>	393 ± 30	423 ± 60	363 ± 43	452 ± 30
<i>Magnezij (mg/100 g s.t.)</i>	146 ± 49	136 ± 24	143 ± 17	130 ± 15
<i>Kalcij (mg/100 mg s.t.)</i>	186 ± 54	117 ± 11	108 ± 15	41,62 ± 10
<i>Željezo (mg/100 g s.t.)</i>	31 ± 10	53 ± 15	33 ± 5	42 ± 6

<i>Natrij (mg/100 g s.t.)</i>	30 ± 4	33 ± 2	34 ± 6	71 ± 9
<i>Bakar (mg/100 g s.t.)</i>	1,06 ± 0,5	1,31 ± 0,3	1,18 ± 0,3	1,22 ± 0,8
<i>Cink (mg/100 g s.t.)</i>	1,67 ± 0,2	1,97 ± 0,6	2 ± 0,2	1,88 ± 0,2
<i>Olovo (mg/100 g s.t.)</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Kadmij (mg/100 g s.t.)</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

\*Uzorci su dobiveni u tri primjerka u prvom tjednu svakog mjeseca. Srednje vrijednosti unutar istog retka s različitim slovom superskripta značajno su se razlikovale pri  $p < 0,05$  prema Duncanovom (1955.) testu višestrukog raspona. n.d.: nije detektirano.

Pektini su prisutni uz celulozu i imaju ulogu u održavanju čvrstoće ploda i zaštiti arome. Oni se otapaju u vodi i stvaraju teksturnu bazu, odnosno bubre, osiguravajući čvrstoću. Sirova vlakna se pak nalaze u prosjeku u količini od 20 % u perikarpu, 18 % u sjemenu i 20-40 % u mljevenoj ljutoj papričici. Sadržaj proteina iznosi 16-17 % u perikarpu te 18 % u sjemenci, samim time proteini predstavljaju važan izvor nutritivne vrijednosti. Lipidi imaju udio od 10 do 14 % u mljevenoj paprici, a najveći dio zauzimaju nezasićene masne kiseline s 18 ugljikovih atoma. Bitna komponenta izgradnje okusa paprike su organske kiseline. Sam plod sadrži mali udio organskih kiselina, od kojih najveći udio čine jabučna i limunska kiselina. Od makroelementa zastupljeni su kalcij, natrij, fosfor te magnezij, dok od mikroelementa se ističu bakar, cink, kobalt te mangan (Zeiner i sur., 2023). Više od 125 hlapljivih spojeva identificirano je u svježoj i prerađenoj paprici, no njihov točan utjecaj na aromu još nije potpuno poznat (Conforti i sur., 2007).

## 2.3. BIOAKTIVNE KOMPONENTE PAPRIKE

Prethodno je potvrđeno da bioaktivni spojevi poput fenolnih spojeva i kapsaicinoida prisutnih u voću i povrću mogu imati preventivno ili čak terapijsko djelovanje u slučaju nekih uobičajenih kroničnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom u ljudskom tijelu (Zhuang i sur., 2012).

### 2.3.1. Fenoli i flavonoidi

Fenolni spojevi predstavljaju skupinu sekundarnih metabolita koje biljke proizvode kao odgovor na prilagodbu na različite stresne uvjete, uključujući biotski (infekcije, ozljede) i abiotički stres (stres uzrokovan nedostatkom vode, hladnoćom ili jakim svjetlom) (Kumar i sur.,

2023). Strukturna karakteristika fenola je hidroksilna skupina koja se veže na aromatski prsten. Flavonoidi su raznolika skupina spojeva koji se nalaze u biljkama, a njihova sposobnost antioksidacijskog djelovanja ovisi o broju i rasporedu hidroksilnih skupina, prisutnosti dvostrukih veza i prisutnosti 4-okso funkcije (Rice-Evans i sur., 1996). Prirodni polifenoli variraju od osnovnih molekula, poput fenolnih kiselina, do visoko polimeriziranih spojeva, kao što su tanini. Oni se uglavnom pojavljuju u konjugiranom obliku, s jednim ili više šećernih ostataka povezanih s hidroksilnim grupama, iako također mogu sadržavati izravne veze između jedinica šećera i aromatičnih atoma ugljika (Bravo, 2009).

Konsumacija paprike, koja sadrži veliku količinu različitih fenola i flavonoida, može djelovati u prevenciji raznih bolesti povezanih s djelovanjem slobodnih radikala, poput kardiovaskularnih bolesti, raka i neuroloških poremećaja, zahvaljujući antioksidativnom potencijalu bioaktivnih spojeva paprike (tablica 2) (Conforti i sur., 2007). Veći udio fenola i flavonoida doprinosi većoj kvaliteti ploda, a prisutni su u svim sortama paprike (Vinković i sur., 2018). Osim toga, prisutnost fenolnih spojeva u paprici doprinosi senzorskim i nutritivnim karakteristikama povrća, mijenjajući boju, okus, miris i ukus samog ploda (Babanovska - Milenkovska i sur., 2016).

Pri usporedbi antioksidativne aktivnosti frakcija flavonoida sorti paprike Tornado i Tajfun, odnosno crvene i zelene sorte, primijećene su znatne razlike. Antioksidativna aktivnost frakcija crvenih paprika bila je viša za 48 % i 43 % u usporedbi s frakcijama zelenih paprika, različitih vrsta *Capsicum annum* L. (Materska i Perucka, 2005). Provedena su različita istraživanja prilikom koji se određuje udio fenola. Herrera - Pool i sur. (2021) su odredili da je metanol bolji izbor otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva iz listova kineske paprike *Capsicum chinese* u usporedbi s acetonom i heksanom. Carvalho i sur. (2015) su proučavali osam različitih genotipova paprike *Capsicum*, uključujući *C. annum*, kao što je žuta sorta Pimenta amarela, te su otkrili ukupni sadržaj fenola od 4,8 mg/g. Chávez-Mendoza i sur. (2015) su odredili prisutnost ukupnog fenolnog sadržaja od 0,7 do 1,11 mg/g suhe tvari (dw) u *C. annum* var sorti. Proizvodnja fenolnih spojeva tijekom rasta biljaka igra važnu ulogu u suočavanju s brojnim stresnim čimbenicima, bilo da su oni biotski ili abiotički. Ovaj proces također ima značajan utjecaj na prilagodbu biljaka i na njihovu interakciju s okolišem (Herrera - Pool i sur., 2021).

Veliki broj polifenola mogu imati ulogu u prirodnoj zaštiti protiv biotskih (kao što su plijesni, bakterije i insekti) i abiotičkih (poput suše, izloženosti metalima i UV zračenju) stresora, pa se tako njihov sastav i količina mijenja kao odgovor na različite stresne uvjete (Tuladhar i sur., 2021). Istraživanja su pokazala da čak i manji polifenolni spojevi prisutni u povrću ili voću

mogu posjedovati značajne biološke benefite te sudjelovati u glavnim biološkim procesima, često djelujući sinergijski (Jeong i sur., 2011).

Primijećeno je smanjenje koncentracije flavonoida tijekom procesa sazrijevanja kod kultivara *C. frutescens*. Ovo smanjenje može biti rezultat metaboličkih promjena u sekundarne fenolne spojeve ili razgradnje putem djelovanja enzima (Sukrasno i Yeoman, 1993).

Sveukupno, zreli plodovi *C. annum* i *C. frutescens* imali su znatno veće ukupne koncentracije flavonoida od kultivara *C. chinense* u zreлом stanju. Vrlo niska koncentracija flavonoida u tim pikantnim paprikama može ukazivati na preusmjeravanje fenolnih prekursora od flavonoida prema kapsaicinoidima (Ribes-Moya i sur., 2020).

**Tablica 2.** Frakcija flavonoida i fenolne kiseline ekstrakta crvene paprike (prema Batiha i sur., 2020)

Komponente	Komponente
<i>trans</i> -p-feruloil- $\beta$ -d-glukopiranozid	<i>trans</i> -p-sinapoil- $\beta$ -d-glukopiranozid
Kvercetin 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozid-7-O- $\beta$ -d-glukopiranozid	Luteolin 6-C- $\beta$ -d-glukopiranozid-8-C- $\alpha$ -L-arabinopiranozid
<i>trans</i> -p-feruloil alkohol-4-O-[6-(2-metil-3-hidroksipropionil) glukopiranozid	Apigenin 6-C- $\beta$ -d-glukopiranozid-8-C- $\alpha$ -L-arabinopiranozid
Luteolin 7-O-[2-( $\beta$ -d-apiofuranozil)- $\beta$ -d-glukopiranozid]	Kvercetin 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozid i luteolin-7-O-(2-apiofuranozil-4-glukopiranozil-6-malonil) glukopiranozid
Kvercetin-3-O-L-ramnozid	

### 2.3.2. Kapsaicin i dihidrokapsaicin

Kapsaicin je bijeli kristal bez mirisa s izrazitom oštrinom. Osjetljivost na njegovu oštrinu može se primijetiti već pri razrjeđenju od jednog dijela kapsaicina na 100 000 dijelova. Ima molekulsku masu od 305,41 g/mol, talište pri 65 °C i vrelište u rasponu od 210 do 220 °C. Kapsaicinoidi su spojevi odgovorni za osjećaj vrućine i pikantan okus koji karakteriziraju mnoge sorte paprike (Batiha i sur., 2020).

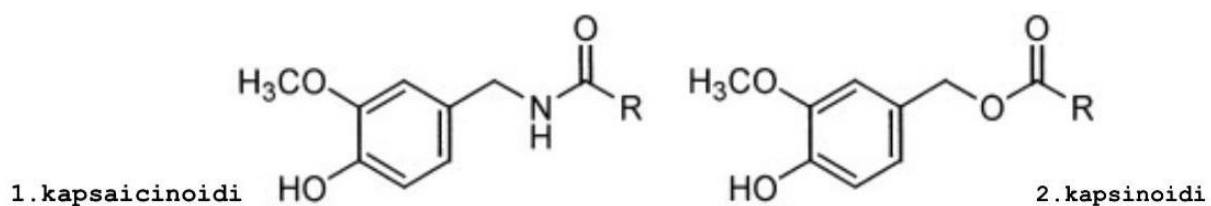
Kapsaicinoidi su derivati benzilamina, a razlike u njihovoj strukturi uglavnom su povezane s njihovim acilnim dijelovima (slika 2). Osnovna razlika između kapsaicinoida je u duljini



alifatskog bočnog lanca, postojanosti ili odsutnosti dvostruke veze, mjestu točke grananja i njihova relativna ljutina (Cinar i sur., 2023).

Ovi derivati uključuju tri strukturalna elementa:

- duljinu acilnog lanca koji se proteže od 8 do 13 ugljikovih atoma
- drugi element je način na koji se acilni lanac završava, bilo da je riječ o linearnoj, izo ili anteizo seriji
- treći element je prisutnost ili odsutnost nezasićenosti na poziciji  $\omega$ -3 (kod tipova kapsaicina) ili  $\omega$ -4 ugljikovom atomu (kod homokapsaicina tipa I i II) (Fattorusso i Tagliabatella-Scafati, 2007).



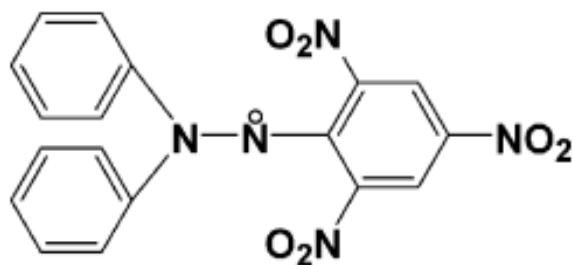
**Slika 2.** Strukturalne razlike kapsaicinoida (prema Diaz i sur., 2004)

U ljutim papričicama, prevladavaju dva prirodna kapsaicinoida: kapsaicin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid) i dihidrokapsaicin (8-metil-N-vanililnonanamid). Ova dva spoja čine otprilike 90 % ukupnog broja kapsaicinoida koji su prisutni u ljutim varijantama paprike. Osim navedena dva kapsaicinoida, u ljutim papričicama nalaze se i drugi manji kapsaicinoidi, uključujući nordihidro-kapsaicin, norkapsaicin, homokapsaicin I i II, homodihidro-kapsaicin I i II, nornorkapsaicin, nornornorkapsaicin i nonivamid (Luo i sur., 2011). Kapsaicinoidi unutar paprike oksidiraju pomoću peroksidaza, prilikom čega nastaju dimeri kapsaicina koji imaju utjecaj na osjetne neurone (Deng i sur., 2019). Biosinteza kapsaicinoida započinje otprilike 20 dana nakon postanteze, a uključuje nekoliko enzima u biosintetskom procesu. Intenzitet ljutine varira ovisno o vrsti i sorti *Capsicum* paprike, a može se također mijenjati pod utjecajem sadržaja kapsaicina i dihidrokapsaicina te drugih čimbenika kao što su stupanj razvoja ploda i uvjeti rasta u okolini (Garces-Claver i sur., 2006).

Akumulacija kapsaicinoida započinje u ranoj fazi razvoja ploda, postižući svoj maksimum u kasnijoj fazi sazrijevanja ploda. Međutim, zreli plodovi su pokazali smanjenje sadržaja kapsaicinoida (Guijarro-Real i sur., 2023). Osim toga, na temelju varijacija u aktivnosti enzima fenilalanin amonijak - liaze, koji je povezan s biosintezom kapsaicinoida, i većim nakupljanjem ovih spojeva u placenti, zaključeno je da se kapsaicinoidi sintetiziraju isključivo u placenti (Vasquez-Espinosa i sur., 2020).

## 2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Slobodni radikali, uglavnom reaktivne kisikove vrste, nastaju u živim sustavima kao rezultat različitih metaboličkih procesa i okolišnih stresova. DPPH predstavlja 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil radikal, koji se uvelike koristi u određivanju antioksidacijske aktivnosti (slika 3) (Dawidowicz i sur., 2012).



**Slika 3.** Molekula DPPH (prema Huang i sur., 2005)

DPPH test je često primijenjena metoda za procjenu antioksidacijskog potencijala molekula antioksidansa te se smatra standardnom i jednostavnom kolorimetrijskom metodom za analizu čistih spojeva s antioksidativnim svojstvima. Iako DPPH test pokazuje ograničene sličnosti s peroksidnim radikalima, obično se koristi za kvantificiranje antioksidativnog sadržaja različitih vrsta voća, povrća i žitarica (Mishra i sur., 2012). DPPH metoda se može primjenjivati u vodenim i nepolarnim organskim otapalima te također za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa (Kedare i Singh, 2011). Metoda se temelji na pretpostavci da je antioksidacijska aktivnost jednaka njegovom kapacitetu davanja elektrona ili takozvanoj redukcijskoj moći (Plank i sur., 2012). Unatoč svojoj jednostavnosti i nedostatku potrebe za posebnom obradom uzorka, osjetljivost DPPH testa može biti pod utjecajem različitih faktora. Ti faktori uključuju vrstu i količinu otapala koje se koristi, prisutnost i koncentraciju vodika i metalnih iona, kao i svježinu DPPH reagensa (Dawidowicz i sur., 2012).

## 2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA

Za provedbu konvencionalne čvrsto-tekuće ekstrakcije i izolaciju bioaktivnih spojeva dostupan je širok spektar različitih postupaka, stoga je danas teško u prehrambenoj, kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji naći proizvodni pogon koji ne koristi neki od klasičnih postupaka ekstrakcije, najčešće kruto-tekuća ekstrakcija. Takvi postupci se konstantno unaprjeđuju upravo u svrhu povećanja iskorištenja i čistoće konačnih proizvoda, ali i zbog ekonomskih i ekoloških razloga, s obzirom na pojavu trendova održivih procesa.

Konvencionalni postupci zahtijevaju veliki utrošak energije i vremena, a za čistoću i funkcionalnost proizvoda je bitna regulacije temperature, s obzirom na to da je veliki broj bioaktivnih spojeva termolabilan (Ince i sur., 2013).

Čvrsto-tekuća ekstrakcija biljnog materijala je sve češće korišten postupak jer se u tim ekstraktima može naći širok raspon bioaktivnih spojeva, koji mogu pronaći svoj potencijal u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. U središtu istraživanja današnjice, kako u znanosti, tako i u industriji jest pronaći ekstrakcijske metode koje će dati veće iskorištenje, ali uz pogodnosti poput korištenja manje štetnih i toksičnih otapala, štednju energiju i očuvanje zdravlja prirode i ljudi. Najčešće korištene metode ekstrakcije su fizička ekstrakcija (prešanje), ekstrakcija otapalima (maceracija), ekstrakcija superkritičnim fluidima, ultrazvučna, mikrovalna ekstrakcija, te ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem.

#### 2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (UAE, engl. *Ultrasound-assisted extraction*) predstavlja suvremenu metodu za učinkovit oblik ekstrakcije zbog jednostavne opreme i niske cijene. Ultrazvuk kao suvremena tehnologija se primjenjuje u različitim poljima, gdje je najpoznatija u medicini, a od nedavno ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija predstavlja alternativu konvencionalnoj ekstrakciji s obzirom na to da je dokazano dobivanje većeg iskorištenja ciljanih spojeva u ekstraktu, uz visoku reproduktivnost, manju potrošnju otapala, nižu temperaturu, kraće vrijeme ekstrakcije, lako rukovanje i rad tijekom procesa, kao i bolju kinetiku i veće ukupne prinose ekstrakcije (Chemat i sur., 2011; Vinatoru, 2001). Ultrazvuk ima mehanički učinak koji pomaže prodoru otapala u matricu uzorka te povećava površinu dodira između čvrste i tekuće faze. Uz poboljšani prijenos mase putem procesa kavitacije, dolazi do povećanog oslobađanja unutarstaničnih komponenti u okolni medij (Barbero i sur., 2008). UAE ima nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, među kojima su upotreba netoksičnih otapala (voda), smanjena potrošnja energije, skraćeno vrijeme trajanja procesa i niža temperatura, što je idealno za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Pavlović i sur., 2021).

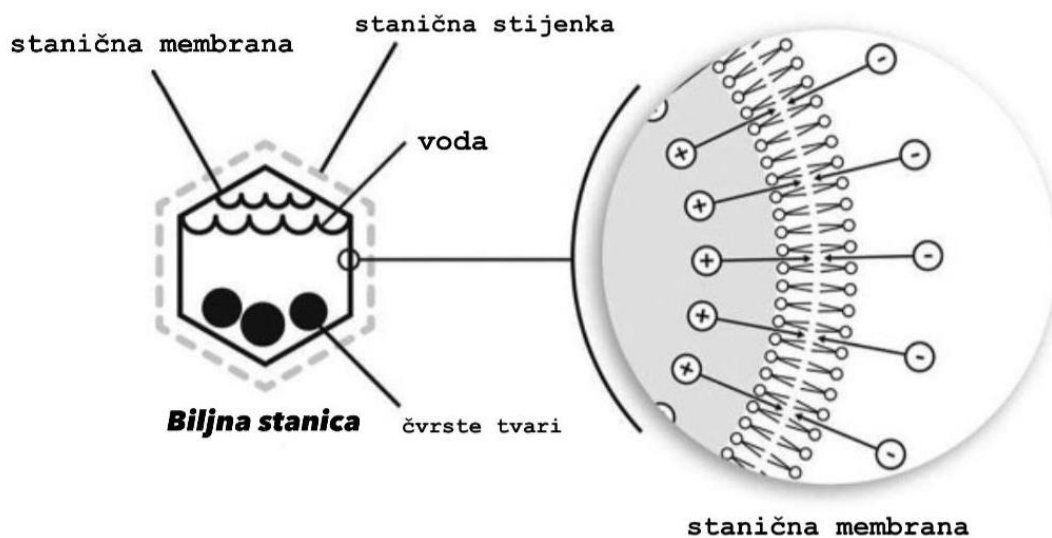
Prilikom odvijanja UAE dolazi do različitih fizikalno-kemijskih pojava, koje su odgovorne za ultrazvučni učinak prilikom ekstrakcije biljnog materijala: vibracije, tlak, smične sile, učinak komprimiranja i dekomprimiranja mjehurića, kavitacija, formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (Tiwari, 2015). Međutim, najistaknutija je kavitacija, koja se javlja prolaskom valova kroz ekstrakcijsko sredstvo, uzrokujući stvaranje mjehurića plina uslijed promjene tlaka. Razlika koja nastaje naizmjeničnim komprimiranjem i dekomprimiranjem mjehurića naposljetku dovodi do implozije, čija je posljedica naglo povećanje temperature i tlaka.

Prilikom provođenja ekstrakcije biljnog materijala, ultrazvučni valovi omogućuju prodor otapala u pore, čime se ubrzava prijenos tvari iz sirovine u otapalo (Chemat i sur., 2011).

#### 2.4.2. Pulsirajuće električno polje

Pulsirajuće električno polje (PEP) je napredni netoplinski postupak koji se uglavnom primjenjuje za konzerviranje hrane s visokom električnom vodljivošću, kao što su tekuća ili polutekuća hrana. Osim konzerviranja, metoda zasnovana na intenzivnim električnim impulsima prethodno je pokazala mogućnost povećavanja prijenosa mase bez utjecaja na nutritivna i organoleptička svojstva hrane (Naliyadhara i sur., 2022).

Princip djelovanja PEP-a temelji se na kretanju iona potaknutim električnim poljem. Svaka stanica unutar tkiva je omeđena membranom koja ima izolacijsku ulogu. Provođenjem električnog polja, ioni unutar i izvan stanice se kreću duž smjera električnog polja, što rezultira polarizacijom stanice (Weaver, 2000). Djelovanjem PEP-a na biljne sirovine, dolazi do netermičke elektroplazmolize staničnog materijala, čime se stvaraju pore. Stvaranje pora uzrokuje povećanje propusnosti stanične membrane, što dovodi do ubrzanja prijenosa mase (slika 4) (Toepfl i sur., 2014).



**Slika 4.** Razaranje pora djelovanjem PEP-a (prema Siemer i sur., 2018)

Standardna jedinica pulsirajućeg električnog polja sastoji se od nekoliko osnovnih komponenata: generatora visokonaponskih impulsa, komore za tretman, sustava za manipulaciju tekućinama te uređaja za kontrolu i nadzor. Generirani impulsi se primjenjuju kroz par elektroda postavljenih unutar komore za tretman, a između elektroda smješta se sirovina koja se obrađuje. Ovisno o vrsti tvari koja se obrađuje (čvrsta, polu-čvrsta, tekuća, polu-

tekuća), komora za tretman može biti podijeljena na komore za obradu u šaržama ili komore za kontinuiranu obradu. Kontinuirani tip je prikladan za industrijske procese jer omogućuje tekućim i polutekućim proizvodima da prođu kroz komoru putem pumpe. Cijelim procesom upravlja središnje računalo koje postavlja parametre, upravlja radom pumpe te prikuplja podatke s senzora postavljenih unutar komore (Nowosad i sur., 2020).

Ovisno o svojstvima prerađenog prehrambenog proizvoda i željenim učincima, parametri procesa, kao što su jakost električnog polja (izraženo u kV/cm), frekvencija impulsa, širina impulsa, oblik pulsnog vala (kvadratni ili eksponencijalni, unipolarni ili bipolarni) i vrijeme izlaganja (koje je povezano s brzinom protoka i volumenom tekućine u komori elektroda), mogu se prilagoditi prema potrebi (Tsong, 1990). Frekvencija impulsa, ovisno o jakosti polja, može biti reda milisekundi ako je polje umjereno (jakost je manja od 1 kV/cm), dok je za intenzivna električna polja (jakost je veća od 1 kV/cm) frekvencija izražena u mikrosekundama (Deeth i sur., 2007). Istraživanja su također pokazala da predtretman PEP-om značajno poboljšava ekstrakciju različitih komponenti topivih u vodi kao što su polifenoli iz mesnatog dijela ploda te kore jabuke (Wang i sur., 2020).

Uz navedene prednosti PEP-a u konzerviranju hrane, a prilikom postupaka konzerviranja u odnosu na toplinske tretmane dolazi do očuvanja organoleptičkih svojstava i nutrijenata.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci paprike

U svrhu izrade diplomskog rada korištene su različite vrste uzoraka paprike s područja Osječko - baranjske i Zagrebačke županije, ubrane tijekom 2021. i 2022. godine. Paprike su osušene i mljevene te potom skladištene na sobnoj temperaturi na suhom i tamnom mjestu. Za ekstrakciju su korištene osušene i usitnjene sorte ljutih i slatkih paprika s lokalnih OPG-ova iz područja Baranje, te svježi uzorci konzumno dostupnih sorti zelenih i crvenih feferona (sorte Sigaretta di Bergamo) koji su očišćeni i usitnjeni u svježem obliku uz izdvajanje sjemene lože koja je zasebno analizirana. U tablici 3 navedeni su svi uzorci paprika koje su korištene tijekom istraživanja koje je provedeno u dvije faze. U prvoj za razvoj metode za određivanje udjela kapsaicina te u drugoj u kojoj su odbarani najčešće konzumirani uzorci paprike za predtretman ekstrakciji, pulsirajućim električnim poljem.

**Tablica 3.** Vrste paprika korištene tijekom istraživanja

<b>Naziv uzorka</b>	<b>Vrsta paprike</b>
<b>Red Fresno</b>	Ljuta
<b>Hot Portugal</b>	Ljuta
<b>Koral Rosso</b>	Ljuta
<b>Bhut Jolokia</b>	Ljuta
<b>Makedonska Vezenska</b>	Ljuta
<b>Kajenska</b>	Ljuta
<b>Ljuta (2021.)</b>	Ljuta
<b>Slatka (2022.)</b>	Slatka
<b>Ljuta (2022.)</b>	Ljuta
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	Slatka
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	Slatka
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	Slatka
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	Slatka

##### 3.1.2. Laboratorijska oprema

- analitička vaga (Tehničar, 2001, Zagreb, RH)
- tehnička vaga (Sartorius, Velika Britanija)

- spektrofotometar (Konica Minolta CM-700d, Japan)
- spektrofotometar Secomam UviLine 9400 (Secomam Groupe Aqualabo, Francuska)
- Vortex 4 basic (IKA, Velika Britanija)
- HPLC (Agilent Technologies, SAD)
- uređaj za pulsirajuće električno polje, HVG60/1 PEF (Intel d.o.o. Hrvatska)
- konduktometar pH λ 340i/ SET (WTW, Njemačka)
- centrifuga, (Thermo Scientific, Megafuge, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digiplus DL 255 H (Bandelin electronic, Njemačka)

### 3.1.3. Kemikalije

- metanol (80 %) (Kemika, Hrvatska)
- etanol (96 %) (Gramo-mol, Hrvatska)
- acetonitril (Kemika, Hrvatska)
- galna kiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Folin – Ciocalteu reagens (Gram – Mol d.o.o., Hrvatska)
- octena kiselina (Lachner, Češka)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) (Gram – Mol d.o.o., Hrvatska)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma Aldrich, Missouri, SAD)
- trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)
- standard kapsaicina i dihidrokapsaicina (Sigma-Aldrich, Njemačka)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija u metanolu

Za ekstrakciju u metanolu odvagano je na analitičkoj vagi 1 g osušene paprike u 10 mL 80 % otopine metanola. Sadržaj je promiješan, te je ekstrakcija provedena primjenom ultrazvučne kupelji, maksimalne snage 640 W, tijekom 30 minuta na temperaturi od 25 °C te intenzitetu 100 %. Temperatura, vrijeme ekstrakcije i intenzitet ultrazvuka kontrolirani su preko kontrolne ploče uređaja. Nakon završetka ekstrakcije, metanolni ekstrakti su prebačeni u vijale (slika 5) u kojima su čuvani na 4 °C do analize.



**Slika 5.** Metanolni ekstrakti uzoraka paprike (*vlastita fotografija*)

### 3.2.2. Predtretman pulsirajućim električnim poljem

Za PEP tretman korišten je uređaj za pulsirajuće električno polje (HVG60/1 PEP, Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska) koje se sastoji od tri jedinice; kontrolna jedinica, visokonaponski izvor napajanja i visokonaponski generator impulsa. Visokonaponski izvor napajanja predstavlja dio uređaja čiji je zadatak pretvorba ulaznog izmjeničnog napona napajanja 230 V u istosmjerni napon u rasponu od 1 do 60 kV. Visokonaponski generator impulsa dobiveni visoki napon propušta na izlaz u obliku impulsa zadanih parametara. Razmak između elektroda iznosio je 2 cm, dok je trajanje pulsa iznosilo 0,5  $\mu$ s. U reaktor uređaja je dodano 5 g uzorka otopljeno u 20 mL 80 % otopine metanola. Uzorak se nalazio između dvije elektrode: elektrode uzemljena i visokonaponske elektrode. Obje elektrode su od nehrđajućeg čelika.

Dizajniran je eksperimentalni postupak s 15 različitih pokusa (tablica 4). Tijekom istraživanja korištene su sljedeće sorte. Za slatku papriku suha mješavina više različitih sorti sa većinskim udjelom sorte Sigaretta di Bergamo. Ljuta u mješavini više različitih sorti, pri čemu su dominantne sorte Makedonska Vezenska i ljuti feferon, te kajenska paprika sorte Kajenska (ljuta). Uzorci su označeni različitim slovima, te oznake imaju sljedeće značenje: S = slatka paprika, LJ = ljuta paprika, K = kajenska paprika. Nakon tretmana PEP-om provedena je ultrazvučna ekstrakcija. Metanolni ekstrakti su potom centrifugirani 5 minuta pri 5000 okretaja na sobnoj temperaturi. Supernatant je nakon centrifugiranja filtriran kroz filter papir. Filtratu je određena koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost, te je HPLC metodom određena koncentracija kapsaicina i dihidrokapsaicina. Uzorcima su određena i fizikalno - kemijska svojstva - pH, električna provodljivost te boja.



**Tablica 4.** Dizajn eksperimenta za tretman pulsirajućim električnim poljem

	<b>kV/cm</b>	<b>t(min)</b>	<b>uzorak</b>
<b>1</b>	2,0	1,0	LJ
<b>2</b>	7,5	1,0	LJ
<b>3</b>	2,0	5,0	LJ
<b>4</b>	7,5	5,0	LJ
<b>5</b>	2,0	3,0	S
<b>6</b>	7,5	3,0	S
<b>7</b>	2,0	3,0	K
<b>8</b>	7,5	3,0	K
<b>9</b>	5,0	1,0	S
<b>10</b>	5,0	5,0	S
<b>11</b>	5,0	1,0	K
<b>12</b>	5,0	5,0	K
<b>13</b>	5,0	3,0	LJ
<b>14</b>	5,0	3,0	LJ
<b>15</b>	5,0	3,0	LJ

### 3.2.3. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava tretiranih uzoraka

#### 3.2.3.1. *Određivanje pH vrijednosti*

Određivanje pH provedeno je na digitalnom pH - metru (AOAC, 2000). Mjerenje pH vrijednosti provedeno je uranjanjem elektrode u uzorak te direktnim očitavanjem pH vrijednosti na zaslonu uređaja.

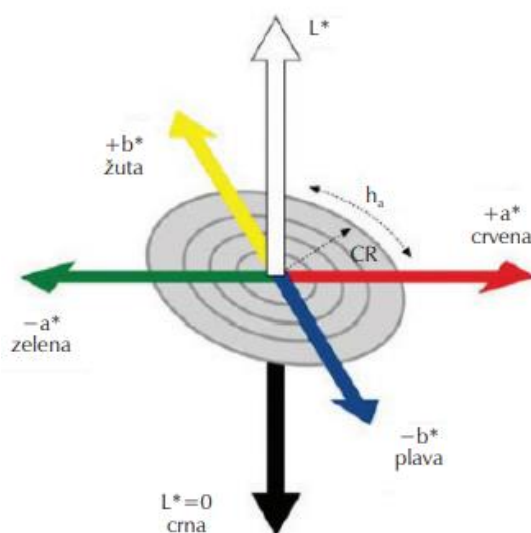
#### 3.2.3.2. *Određivanje električne provodljivosti*

Određivanje električne provodljivosti provedeno je na digitalnom konduktometru nakon uranjanja elektrode u uzorak.

#### 3.2.3.3. *Određivanje boje*

Određivanje boje provedeno je spektrofotometrijskom metodom, prilikom čega je kao slijepa proba služila kiveta s destiliranom vodom.

Mjerenje boje zasniva se na parametrima  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ . Koordinata  $L^*$  označava svjetlinu, a njena ljestvica se kreće se od 0 do 100 gdje 0 označava crnu, a 100 bijelu boju. Koordinata  $a^*$  označava crvenu, odnosno zelenu boju čiji se spektar kreće od -127 (čista zelena) do +127 (čista crvena). Koordinata  $b^*$  predstavlja žutu, odnosno plavu boju. Njena ljestvica kreće se od -127 (čista plava) do +127 (čista zelena) (Sticker i Orengo, 1995.) Raspodjela boja u njihovom sustavu prikazana je na slici 6.



**Slika 6.** Sustav boja zasnovan na parametrima  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  (prema Mihoci, 2015)

$\Delta E$  predstavlja ukupnu razliku obojenosti ( $\Delta E^*$ ) skladištenih uzoraka u odnosu na početni uzorak i računa se prema jednadžbi 1:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [1]$$

$$\Delta L^* = L^*_1 - L^*_0, \Delta a^* = a^*_1 - a^*_0, \Delta b^* = b^*_1 - b^*_0$$

$L^*_0, a^*_0, b^*_0$  = parametri boje izmjereni u početnom uzorku

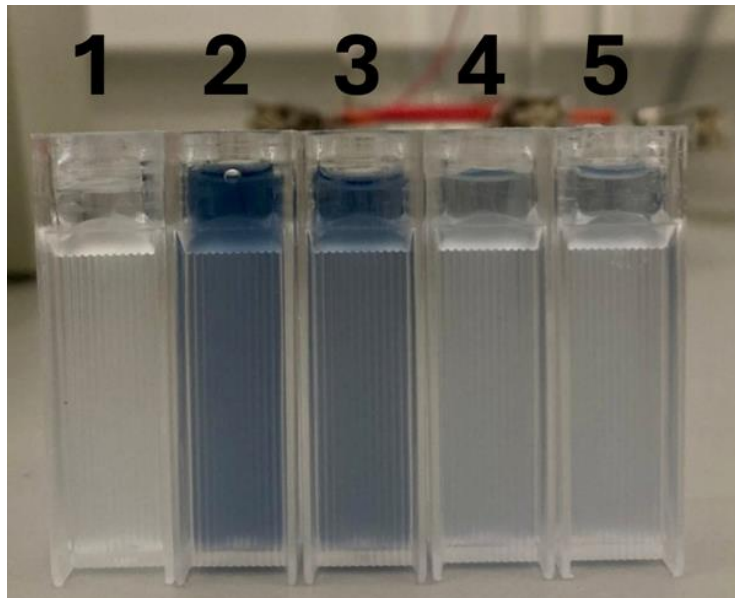
$L^*_1, a^*_1, b^*_1$  = parametri boje izmjereni u sušenim uzorcima

#### 3.2.4. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provedeno je spektrofotometrijski na uzorcima paprika nakon njihove ekstrakcije u metanolu. Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin – Ciocalteau reagensa i stvaranjem produkta koji je plave boje. Reagens se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline nakon čijeg

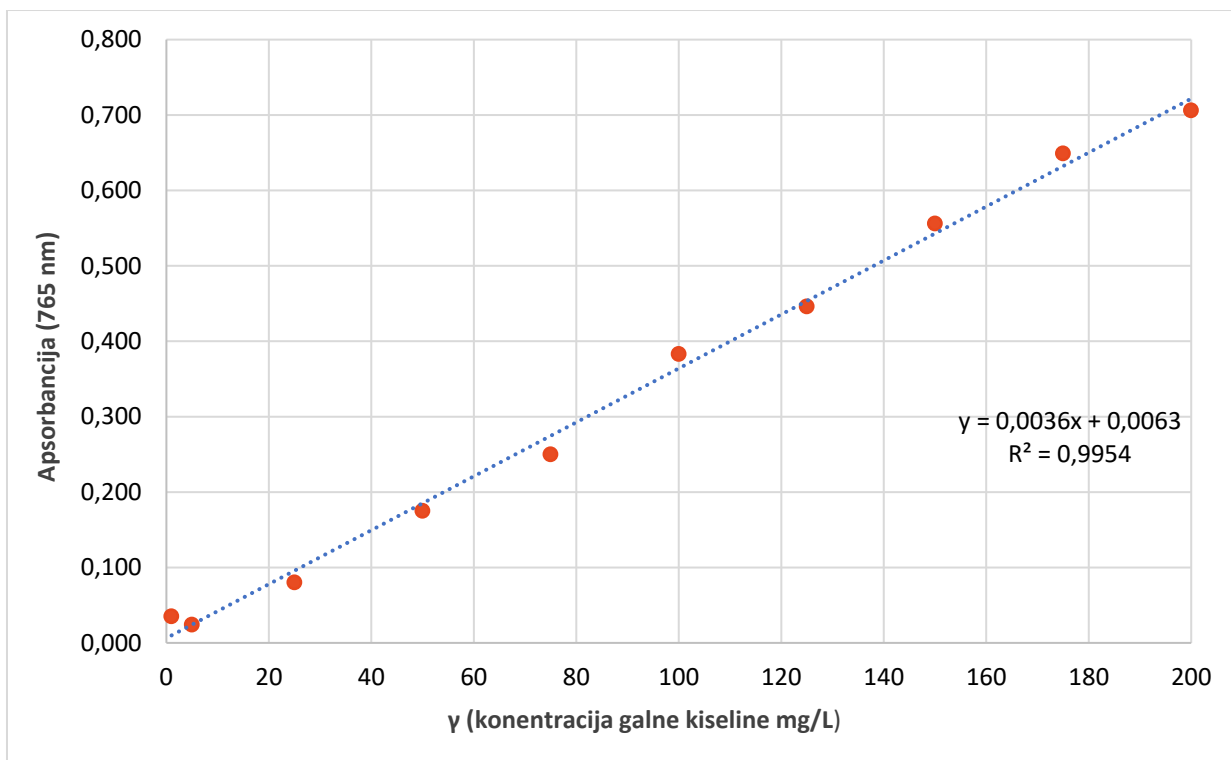
dodavanja dolazi do reakcije između fenoksid iona iz uzorka i Folin – Ciocalteovog reagensa prilikom čega fenoksid ion oksidira, a reagens se reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Spektrofotometrijsko mjerenje se obavlja pri 765 nm te je taj intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji fenola (Shortle i sur., 2014).

U staklenu epruvetu je otpipetirano 100  $\mu$ L ekstrakta uzorka paprike, 200  $\mu$ L Folin – Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto uzorka dodano 100  $\mu$ L destilirane vode. Nakon 3 minute dodano je 1 mL 20 %-tne zasićene otopine natrijeva karbonata i pomiješano je pomoću vortexa. Reakcijska smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji 25 min pri 50 °C stupnjeva, te je provedeno spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije uzoraka pri 765 nm (slika 7). Sva mjerenja provedena su u tri paralele i rezultat je izražen kao srednja vrijednost.

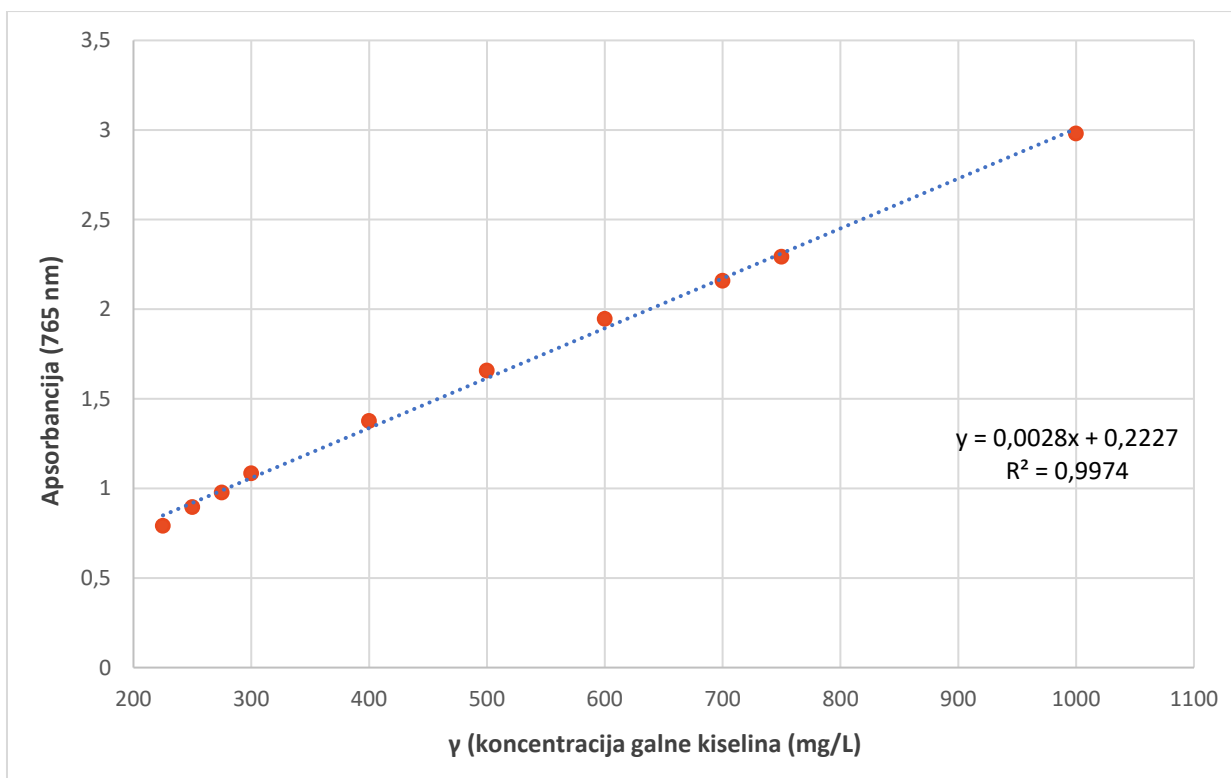


**Slika 7.** Kivete s uzorcima za određivanje ukupnih fenola: 1. slijepa proba 2. slatka paprika 3. ljuta paprika 4. crvena svježa paprika 5. zelena svježa paprika (*vlastita fotografija*)

Udio ukupnih fenola određen je preko baždarnog pravca galne kiseline (1-200 mg/mL) i (225-1000 mg/mL) (slika 8 i 9).



**Slika 8.** Baždarni pravac galne kiseline pri koncentracijama (1-200 mg/L).



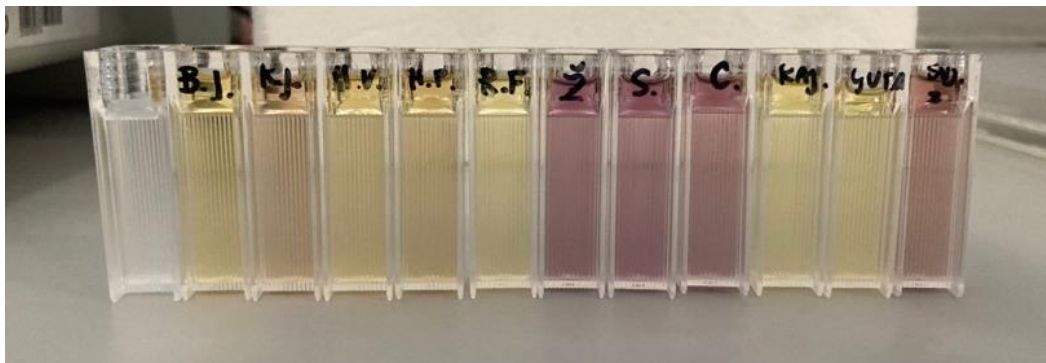
**Slika 9.** Baždarni pravac galne kiseline pri koncentracijama (225 - 1000 mg/L)

### 3.2.5. Određivanje antioksidativnog statusa paprike primjenom DPPH metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti provedeno je DPPH metodom. Mjeri se promjena boje otopine DPPH radikala u njezin reducirani oblik DPPH koji je žuto obojen (Mishra i sur., 2012).

Kako bi adsorpcija antioksidanata iz uzoraka bila lakša, reakcija se uobičajeno izvodi u otopini metanola i vode (također se može koristiti za mjerenje lipofilnih i hidrofilnih tvari). Osim lake primjene, prednost DPPH metode leži u tome da DPPH radikal ima moć da reagira s cijelim uzorkom te slabim antioksidansima. Pod svjetlom je moguća manja izmjerena apsorbancija pa se otopina DPPH tijekom odvijanja reakcije čuva u mraku (Kedare i Singh, 2011).

Za početni korak za provođenje DPPH metode pripremljena je 0,1 mM otopina DPPH otapanjem 3,94 mg DPPH u tikvici od 100 mL te nadopunjavanjem s 80 %-tnom otopinom metanolom do oznake. Potom je dodano 100  $\mu$ L ekstrakta uzorka i 2 mL 0,01 mM otopine DPPH unutar kivete, koja je nakon toga prekrivena parafilmom te lagano protresena. Prilikom pripreme slijepe probe umjesto uzorka dodano je otapalo. Smjesa je inkubirana narednih 25 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (slika 10). Nakon proteklog vremena, provedeno je mjerenje apsorbancije na spektrofotometru pri 518 nm. Sva mjerenja provedena su u tri paralele i rezultat je izražen kao srednja vrijednost.

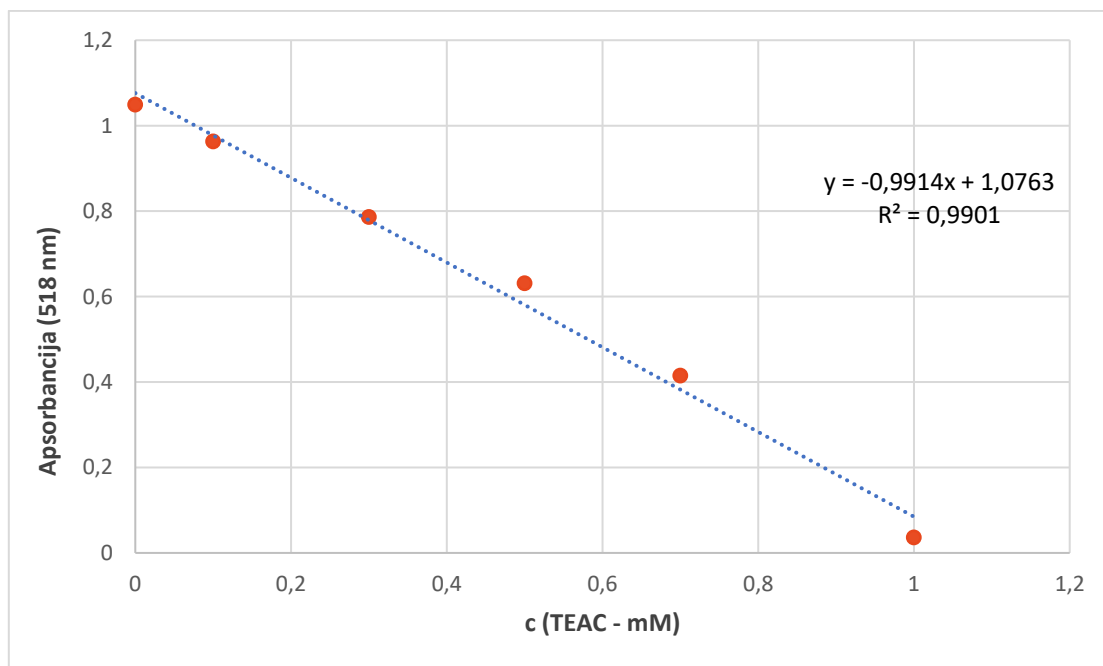


**Slika 10.** Kivete s uzorcima za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom nakon inkubacije (vlastita fotografija)

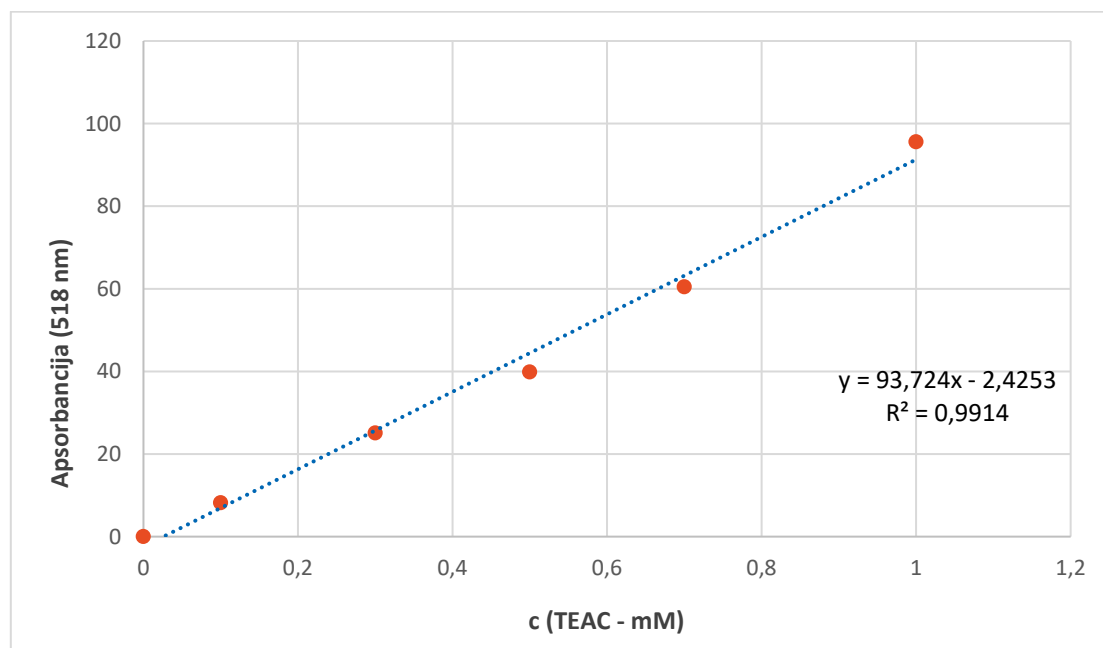
Antioksidativni kapacitet određen je preko baždarnog pravca (otopina Troloxa) koncentracija 0,1-1 mM. Slika 11. prikazuje ovisnost koncentracije Troloxa kao referentnog materijala antioksidativnosti o apsorbanciji, dok slika 12. prikazuje redukciju. Redukcija se računa prema jednadžbi 2:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0 * 100} \quad [2]$$

U kojoj  $A_0$  predstavlja kontrolu, tj. MeOH umjesto Troloxa, a  $A_1$  predstavlja apsorbanciju troloxa pri 518 nm.



**Slika 11.** Baždarni pravac antioksidativnog kapaciteta



**Slika 12.** Prikaz redukcijskog kapaciteta - DPPH

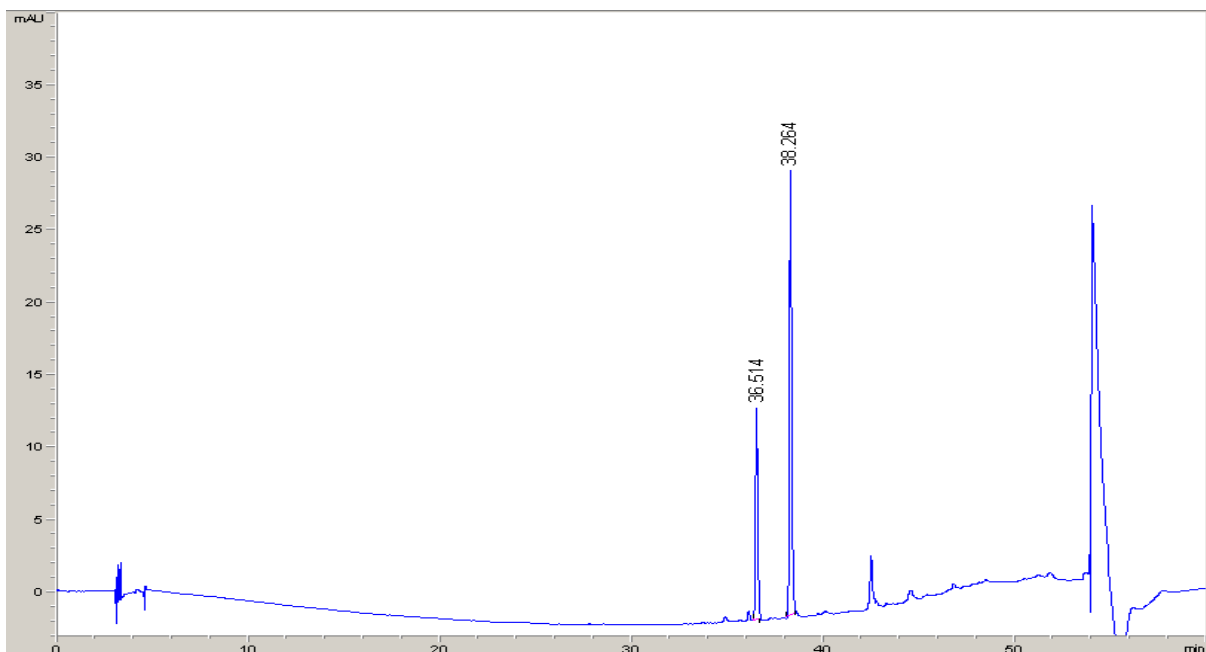
### 3.2.6. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Metoda HPLC se temelji na ubrizgavanju uzorka u stupac propusnog materijala (stacionarnu fazu) i tekuću fazu (mobilnu fazu) gdje dolazi do pumpanja tekuće faze kroz kolonu uz veći tlak. Načelo razdvajanja temelji se na adsorpciji otopljenih tvari na stacionarnoj fazi na osnovi njegovog afiniteta prema stacionarnoj fazi (Bhardwaj, 2015).

Za određivanje kapsaicina i dihidrokapsaicina razvijena je nova metoda prema modifikaciji početne metode od Souza Sora i sur., 2015. Za analizu uzoraka uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti korištena je C30 nepolarna kolona (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instalirana na Agilent Technologies (LC 1200). Kolona je održavana na 40 °C, dok je detekcija provedena na 280 nm. Injektiran je volumen od 20 µL svakog uzorka. Mobilne faze su se sastojale od mobilne faze (A) koja je predstavljala 1 % octenu kiselinu u redestiliranoj vodi te mobilne faze (B) koja je bila metanol, čistoće 99,9 %. Razdvajanje je omogućeno nakon 60 minuta pomoću linearnog gradijenta dviju mobilnih faza (tablica 5). Protok je tekao brzinom od 0,7 mL/min tijekom cijele analize. Metanolni ekstrakti su prije injektiranja profiltrirani kroz PTFE filter u vijalice od 1,5 mL.

**Tablica 5.** Gradijent za HPLC/UV/VIS/PDA analizu kapsaicina i dihidrokapsaicina

<b>t (min)</b>	<b>otapalo (A)</b>	<b>otapalo (B)</b>
<b>0</b>	90	10
<b>3</b>	90	10
<b>30</b>	50	50
<b>40</b>	40	60
<b>45</b>	0	100
<b>50</b>	0	100
<b>50.10</b>	90	10
<b>60</b>	90	10



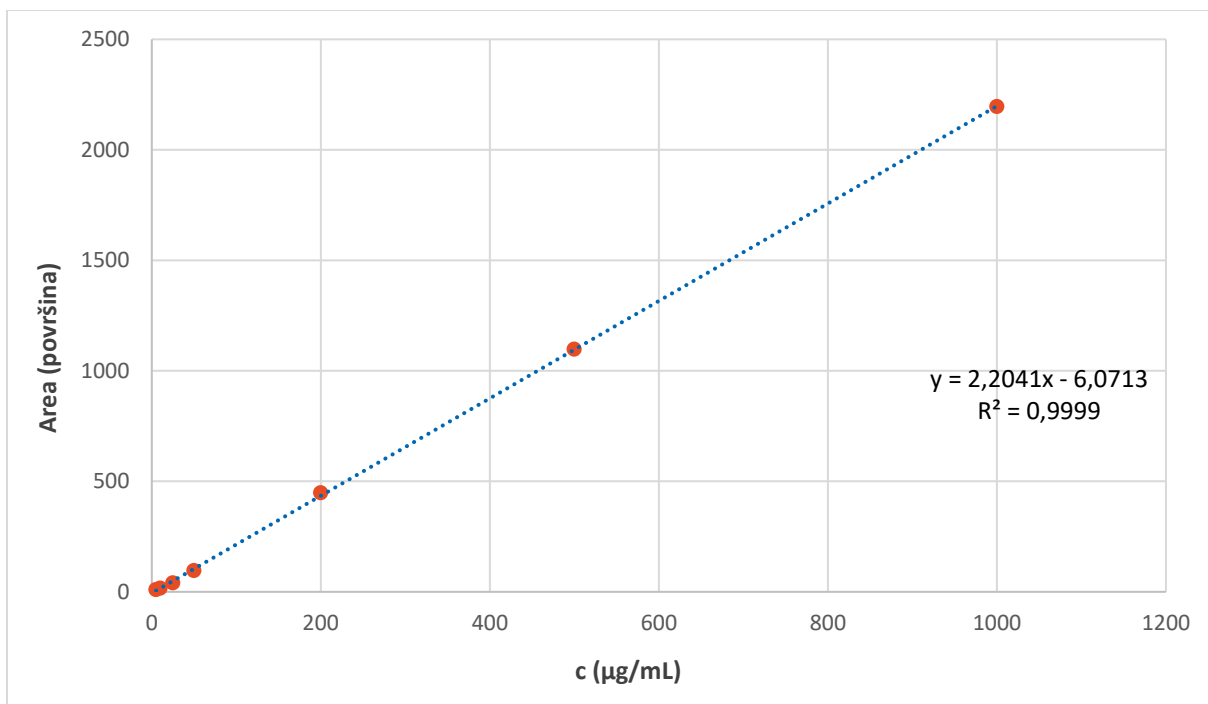
**Slika 13.** Kromatogram s pikovima kapsaicina (36. minuta) i dihidrokapsaicina (38.minuta)

Kapsaicin i dihidrokapsaicin su identificirani usporedbom s retencijskim vremenima standarda (slika 13). Koncentracije kapsaicina i dihidrokapsaicina u ekstraktima određene su iz jednadžbi baždarnih pravaca koji su konstruirani injektiranjem otopina kapsaicina u koncentracijama 1-1000  $\mu\text{g/mL}$  (slika 14) i dihidrokapsaicina u koncentracijama 1-500  $\mu\text{g/mL}$  (slika 15). Maseni udjeli kapsaicina i dihidrokapsaicina izračunati su prema formuli 3 i 4.

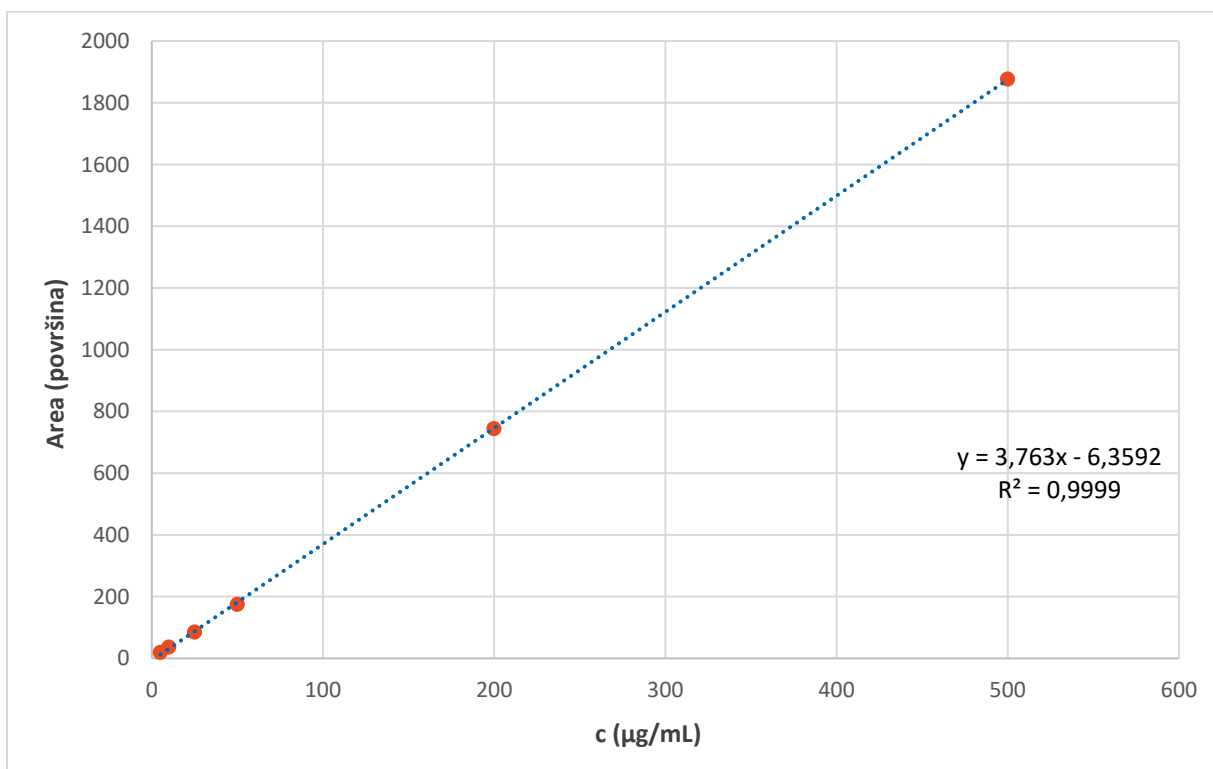
$$\text{a) kapsaicin: } w = \frac{\textit{konc. kapsaicina iz baždarnog pravca}}{100} \left( \frac{\textit{mg}}{\textit{g}} \right) \quad [3]$$

$$\text{b) dihidrokapsaicin: } w = \frac{\textit{konc. dihidrokapsaicina iz baždarnog pravca}}{100} \left( \frac{\textit{mg}}{\textit{g}} \right) \quad [4]$$





**Slika 14.** Baždarni pravac kapsaicina



**Slika 15.** Baždarni pravac dihidrokapsaicina

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Na temelju rezultata tretmana PEP modelnog sustava, izvedena je analiza varijance (ANOVA) u programu Statgraphics centurion 19 (Statgraphics technologies, SAD), a razina značajnosti svih korištenih statističkih metoda bila je 95 %. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se utvrdile značajne razlike ( $p < 0,05$ ) među primijenjenim tretmanima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

S obzirom na poznate benefite bioaktivnih spojeva prisutnih u paprici, cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj predtretmana PEP-om na ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz odabranih sorti paprike. Prije predtretmana PEP-om proveden je razvoj metode (ultrazvučna ekstrakcija) i odabir uzoraka za predtretman PEP-om. U ekstraktima su određeni fizikalno kemijski parametri s naglaskom na koncentraciju ukupnih fenola, bioaktivnih komponenti, te antioksidacijska aktivnost ekstrakata.

### 4.1. ANALIZA UZORAKA NAKON ULTRAZVUČNIH TRETMANA

#### 4.1.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola u ultrazvučnim ekstraktima

Plodovi paprike predstavljaju bitan izvor biološki aktivnih spojeva, čije najbitnije svojstvo jest antioksidativna aktivnost, koja se uglavnom pripisuje fenolnim spojevima. Djelovanjem ultrazvuka stvara se tlak na staničnu stijenku tkiva paprike, te dolazi do kavitacije u uzorku, te lakšeg prodiranja otapala u materijal i povećanja prijenosa mase. Nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije, spektrofotometrijski je određena koncentracija ukupnih fenola. Rezultati izmjerene koncentracije fenola u uzorcima vidljivi su u tablici 6.

**Tablica 6.** Prikaz udjela ukupnih fenola u uzorcima paprike

Vrsta paprike	Ukupni fenoli (mg/g)
Red Fresno	3,74
Hot Portugal	4,45
Koral Rosso	3,20
Bhut Jolokia	<b>7,95</b>
Makedonska Vezenska	6,20
Kajenska	<b>8,99</b>
Ljuta (2021.)	6,21
Slatka (2022.)	1,98
Ljuta (2022.)	1,43
Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo	<b>0,12</b>
Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo	<b>0,12</b>
Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)	0,95
Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)	1,59

Iz navedenih rezultata je vidljivo kako kajenska paprika sadrži najveći udio fenolnih spojeva masenog udjela 8,99 mg/g, prilikom čega ju slijedi paprika sorte Bhut Jolokia s udjelom od 7,95 mg/g što se može povezati s ljutinom obiju paprika budući da se smatraju jednim od najljućih paprika na svijetu. Također, udio fenola veći je u ljutim paprika nego u slatkim. Shodno tomu, najmanji udio fenola izmjeren je u svježoj zelenoj te svježoj crvenoj paprici, te iznosi 0,12 mg/g za svježu zelenu i svježu crvenu papriku.

Udio fenola povećava se sa stupnjem zrelosti paprike, što znači da crveni plodovi paprike sadrže veće količine fenola nego zeleni plodovi paprike (Chavez – Mendoza, 2015; Zhuang i sur., 2012). Prethodno je utvrđeno da se najviši sadržaj fenola nalazi u crvenoj paprici, iza koje slijedi narančasta, žuta te na kraju zelena (Sun i sur., 2007). Koncentracija prisutnih fenolnih spojeva ovisi od uvjeta uzgoja s obzirom na to da organski uzgoj ima veći utjecaj na razvoj ploda i njegovih sekundarnih metabolita u odnosu na konvencionalni (Hallaman i Rembialkowska, 2012). Udio fenolnih spojeva u paprici ovisi o tretiranju paprike prije i nakon same berbe. Postupci nakon berbe kao što su zamrzavanje, sušenje, rezanje i fermentacija ključni su za količinu arome i fenolnih spojeva proizvoda od paprike (Korkmaz i sur., 2017).

#### 4.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta paprike DPPH metodom nakon ultrazvučne ekstrakcije

Oksidacijski stres je stanično stanje pri kojem dolazi do oštećenja makromolekula (DNA, proteini, lipidi) unutar stanica uslijed neravnoteže između kisikovih reaktivnih vrsta i antioksidacijskih obrambenih sustava organizma, te je razlog za pojavu mnogih bolesti. Stoga, poznavanje sadržaja antioksidanasa i njihove antioksidacijske aktivnost neophodno je za primjenu biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji. DPPH antioksidativnim testom ispitana je inhibicija DPPH radikala različitim ultrazvučnim ekstraktima paprike, te su rezultati prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Prikaz rezultata analize antioksidacijske aktivnosti u uzorcima paprika

<b>Uzorci paprike</b>	<b>Redukcija (%)</b>
<b>Red Fresno</b>	<b>88,08</b>
<b>Hot Portugal</b>	75,98
<b>Koral Rosso</b>	66,16
<b>Bhut Jolokia</b>	<b>83,79</b>
<b>Makedonska Vezenka</b>	83,13
<b>Kajenska</b>	<b>87,04</b>
<b>Ljuta (2021.)</b>	<b>85,99</b>
<b>Slatka (2022.)</b>	77,98
<b>Ljuta (2022.)</b>	56,06
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	44,33
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	67,97
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	62,73
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	77,50

S obzirom na to da se antioksidacijska aktivnost DPPH mjeri spektrofotometrijski, što je manja apsorbancija uzorka to je veća antioksidativnost jer je veća razlika između kontrole i samog uzorka, odnosno veća apsorbancija predstavlja manju antioksidativnost. U tablici 7. vidljivo je da najveću antioksidativnost ima paprika Red Fresno s postotkom redukcije u vrijednosti 88,08 %, nakon koje su slijedili kajenska paprika (87,04 %), ljuta (2021.) (85,99 %) te Bhut Jolokia (83,79 %). Najmanju antioksidativnost, kao što je slučaj i kod udjela fenola, ima svježa zelena paprika s postotkom redukcije od 44,33 %.

Nekolicina studija ukazuje da se antioksidativni kapacitet uzoraka paprike povećava samim sazrijevanjem paprike što se može povezati sa sadržajem hranjivih tvari, polifenola te ostalih nutrijenata (Baenas i sur., 2018). Naime, crvena paprika zbog prisutnih pigmenata, karotenoida i flavonoida ima veću antioksidacijsku aktivnost od zelene paprike jer zelena paprika ima manji sadržaj spomenutih, nutritivno važnih tvari (Sun i sur., 2007). Također, Red Fresno paprika ima najveću antioksidativnu aktivnost, slijedi ju Bhut Jolokia te Hot Portugal. Sve navedene paprike su crvene boje. Fenolne frakcije paprike pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s uljnim frakcijama, koje uključuju karotenoide i tokoferole. Crvena paprika je imala najizraženiju antioksidacijsku aktivnost, dok je narančasta paprika imala najmanju aktivnost. S druge strane, u uljnim ekstraktima, narančasta paprika je pokazala najveću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (Blanco – Rios i sur., 2013).

#### 4.1.3. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Osim učinkovite ekstrakcije bioaktivnih spojeva jednako je bitna učinkovita karakterizacija i identifikacija najprepoznatljivijih kemijskih spojeva uz pomoć tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz primjenu različitih detektora. U ovom radu, korišten je UV-Vis detektor, čija kombinacija uz HPLC doprinosi povećanju pouzdanosti i osjetljivosti karakterizacije najbitnijih spojeva ekstrakata paprike koji su istraživani: kapsaicin i dihidrokapsaicin. Shodno retencijskom vremenu standarda, vidljivi su pikovi koji se pojavljuju u 36. i 38. minuti. U 36. minuti pojavljuje se kapsaicin dok se na 38. minuti pojavljuje dihidrokapsaicin (slika 13).

Tablica 8. prikazuje koncentracije kapsaicina u korištenim ekstraktima uzorcima paprika.

**Tablica 8.** Udio kapsaicina u uzorcima paprike nakon HPLC analize

<b>Vrsta paprike</b>	<b>Maseni udio (mg/g)</b>
<b>Red Fresno</b>	1,36
<b>Hot Portugal</b>	0,72
<b>Koral Rosso</b>	1,41
<b>Bhut Jolokia</b>	<b>10,25</b>
<b>Makedonska Vezenka</b>	0,24
<b>Kajenska</b>	2,40
<b>Ljuta (2021.)</b>	0,85
<b>Slatka (2022.)</b>	0,16
<b>Ljuta (2022.)</b>	0,83
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	n.d.
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo</b>	n.d.
<b>Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	n.d.
<b>Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)</b>	n.d.

\*n.d. – nije detektirano

Vidljivo je da u zelenoj svježoj i crvenoj svježoj paprici kapsaicin nije detektiran, jer se radi o sortama koje nisu ljute. Od uzoraka koji sadrže kapsaicin, najmanja koncentracija kapsaicina detektirana je u slatkoj paprici te iznosi 0,16 mg/g dok je najveća koncentracija kapsaicina detektirana u paprici Bhut Jolokia te iznosi 10,25 mg/g.

Tablica 9. prikazuje koncentracije dihidrokapsaicina u korištenim ekstraktima uzoraka paprike nakon HPLC analize podataka.

**Tablica 9.** Udio dihidrokapsaicina u uzorcima paprike nakon HPLC analize

Vrsta paprike	Maseni udio (mg/g)
Red Fresno	0,46
Hot Portugal	0,23
Koral Rosso	0,53
Bhut Jolokia	<b>2,11</b>
Makedonska Vezenka	0,22
Kajenska	0,78
Ljuta (2021.)	0,41
Slatka (2022.)	n.d.
Ljuta (2022.)	0,40
Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo	n.d.
Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo	n.d.
Svježi zeleni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)	n.d.
Svježi crveni feferon Sigaretta di Bergamo (sjemena loža)	n.d.

\*n.d. – nije detektirano

U zelenoj svježoj i crvenoj svježoj te slatkoj paprici dihidrokapsaicin nije detektiran, što se poklapa s dobivenim rezultatima kapsaicina, izuzev slatke paprike, koja je sadržavala iznimno niske koncentracije kapsaicina u iznosu od 0,16 mg/g. Od uzoraka koji sadrže dihidrokapsaicin, najmanja koncentracija detektirana je unutar Makedonske Vezenke te iznosi 0,22 mg/g, te Hot Portugal s koncentracijom od 0,23 mg/g. Najveća koncentracija dihidrokapsaicina kao i kapsaicina detektirana je u sorti Bhut Jolokia, te iznosi 2,11 mg/g, dok iza nje slijede kajenska (0,78 mg/g) i ljute (2021. i 2022.) paprike s 0,41 mg/g te 0,40 mg/g.

Materska i Perućka, 2005. godine pokazali su da crvena zrela paprika sadrži veći udio kapsaicinoida od zelene paprike, što može dovesti do većeg antioksidativnog kapaciteta (Baenas i sur., 2018).

#### 4.2. ANALIZA UZORAKA NAKON PREDTRETMANA PEP-OM

Na temelju preliminarnih rezultata različitih uzoraka paprike, odabrana su tri najčešće konzumirana uzorka, te je prema eksperimentalnom dizajnu proveden predtretman PEP-om (tablica 4). Djelovanje pulsirajućeg električnog polja na odabrane uzorke slatke, ljute i kajenske

paprike praćeno je pri razlićitim tretmanima uzoraka, te njihov utjecaj na udio ukupnih fenola, antioksidativnu aktivnost te je odrećena i usporećena koncentracija kapsaicina i dihidrokapsaicina. Takoćer, ispitana su fizikalno-kemijska svojstva uzoraka, meću kojima su boja, pH i elektrićna provodljivost.

#### 4.2.1. Odrećivanje pH vrijednosti i elektrićne vodljivosti nakon tretiranja PEP-om

U tablici 10. prikazane su vrijednosti pH vrijednosti i elektrićne vodljivosti odabranih uzoraka paprike.

**Tablica 10.** Vrijednosti pH i elektrićne provodljivosti uzoraka paprike

pH		Elektrićna provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
<b>Slatka</b>	5,88	<b>Slatka</b>	876
<b>Ljuta</b>	5,36	<b>Ljuta</b>	628
<b>Kajenska</b>	5,58	<b>Kajenska</b>	838

Iz tablice 10. je vidljivo da uzorak s najnićom elektrićnom provodljivosti 628  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , ljuta paprika, jest i uzorak s najnićom pH vrijednosti. Isto vrijedi i za uzorak s najvićom vrijednosti pH, slatka paprika, koji ima najviću elektrićnu provodljivost, 876  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Nakon tretiranja uzoraka PEP-om, ispitani su pH i elektrićna provodljivost ekstrakata uzoraka paprike, te su vrijednosti prikazane u tablici 11.



**Tablica 11.** Vrijednosti pH i električne provodljivosti uzoraka paprike nakon tretiranja pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	pH	Električna provodljivost ( $\mu\text{S/cm}$ )
LJ	2,0	1,0	5,48 $\pm$ 0,05	1221 $\pm$ 1,12
LJ	7,5	1,0	5,28 $\pm$ 0,01	1190 $\pm$ 1,50
LJ	5,0	3,0	5,3 $\pm$ 0,03	1179 $\pm$ 1,39
LJ	5,0	3,0	<b>5,22<math>\pm</math>0,05</b>	1187 $\pm$ 2,24
LJ	5,0	3,0	5,25 $\pm$ 0,05	1183 $\pm$ 1,10
LJ	2,0	5,0	5,24 $\pm$ 0,10	1201 $\pm$ 3,14
LJ	7,5	5,0	5,25 $\pm$ 0,12	<b>1158<math>\pm</math>5,10</b>
S	5,0	1,0	5,59 $\pm$ 0,15	1493 $\pm$ 1,11
S	2,0	3,0	5,63 $\pm$ 0,01	1423 $\pm$ 1,09
S	7,5	3,0	5,57 $\pm$ 0,02	1410 $\pm$ 0,99
S	5,0	5,0	5,58 $\pm$ 0,02	1506 $\pm$ 0,87
K	5,0	1,0	5,53 $\pm$ 0,03	1492 $\pm$ 5,14
K	2,0	3,0	<b>5,66<math>\pm</math>0,11</b>	1429 $\pm$ 2,10
K	7,5	3,0	5,56 $\pm$ 0,15	1431 $\pm$ 3,21
K	5,0	5,0	5,51 $\pm$ 0,05	<b>1519<math>\pm</math>1,67</b>

Nakon PEP tretmana, u svim je uzorcima izmjeren porast vrijednosti električne vodljivosti u rasponu od 1158 do 1519  $\mu\text{S/cm}$ , dok je pH vrijednost bila u rasponu od 5,22 do 5,66.

U uzorku ljute paprike, produljenjem vremena tretmana s 1 min na 5 min, pri jednakoj jakosti električnog polja (2 i 7,5 kV), dolazi do pada pH vrijednosti. Isti trend uočljiv je i kod slatke i kajenske paprike. Sukladno rezultatima ukupnih fenola, najveći porast električne provodljivosti bilježi se u prvom uzorku ljute paprike tretiranog s jakošću polja 2,0 kV/cm tijekom jedne minute te iznosi 1221  $\mu\text{S/cm}$ , također isti uzorak bilježi najvišu pH vrijednost (5,48) unutar ljute paprike. U odnosu na ostala dva uzorka, ljuta paprika bilježi duplo veći porast električne provodljivosti u odnosu na native uzorke. Iz tablice 11. vidljivo je da kajenska paprika, tretirana s 5,0 kV/cm tijekom pet minuta ima najveću provodljivost (1519  $\mu\text{S/cm}$ ). Također isti uzorak sadržava najviši postotak antioksidativne aktivnosti s udjelom od 93,90 % (tablica 16), no i najmanju pH vrijednost unutar kajenske paprike (5,51).

Električna provodljivost prati trend povećanja proporcionalno jakosti električnog polja, te vremenu tretmana u svim uzorcima. Povećanjem jakosti polja i vremena tretmana, dolazi do izraženijeg učinka elektroporacije i prodora staničnog sadržaja iz sirovine u otapalo, što vodi do rasta električne provodljivosti.

#### 4.2.2. Određivanje boje nakon tretiranja PEP-om

Prirodni pigmenti prisutni u paprici su uglavnom termolabilni, te osjetljivi na procese koji se primjenjuju u konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, kao što su toplinska, mehanička i kemijska. Stoga se pulsirajuće električno polje javlja kao potencijalna netermalna alternativa za očuvanje prirodnih boja iz prehrambenih sirovina (Bocker i Silva, 2022). Izmjereni parametri boje u uzorku nakon ultrazvučnog tretmana (nativni uzorak) i nakon tretmana PEP-om prikazani su u tablici 12.

**Tablica 12.** Parametri boje u uzorcima paprike prije i nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Jakost (kV/cm)	t (min)	Uzorak	L	a	b	C (ab)	$\Delta E$
Nativni uzorak		LJ	73,64	27,79	112,5	115,88	
2,0	1,0	LJ	<b>60,14</b>	<b>43,74</b>	<b>106,78</b>	<b>115,39</b>	<b>21,66</b>
7,5	1,0	LJ	57,43	40,23	100,80	108,54	23,65
2,0	5,0	LJ	57,27	41,00	101,05	109,48	23,73
7,5	5,0	LJ	56,43	42,82	101,25	109,93	25,46
5,0	3,0	LJ	56,95	41,80	101,18	109,47	24,55
5,0	3,0	LJ	58,20	41,72	102,56	110,72	23,04
5,0	3,0	LJ	58,61	41,10	102,75	110,72	22,31
Nativni uzorak		S	74,11	30,17	115,75	119,61	
2,0	3,0	S	43,14	36,74	82,89	90,66	44,67
7,5	3,0	S	<b>20,72</b>	<b>26,59</b>	<b>50,89</b>	<b>57,42</b>	<b>82,03</b>
5,0	1,0	S	60,87	38,72	104,64	111,57	15,02
5,0	5,0	S	52,96	36,76	94,30	101,21	29,39
Nativni uzorak		K	74,28	21,08	102,45	104,59	
2,0	3,0	K	54,01	43,44	97,03	106,31	30,66
7,5	3,0	K	51,83	43,10	93,85	103,27	32,61
5,0	1,0	K	50,54	43,57	92,28	102,05	32,79
5,0	5,0	K	50,15	44,22	92,00	102,08	33,52

*L* vrijednost označava svjetlinu boje. U svim uzorcima paprika, nativni uzorci imaju sličnu *L* vrijednost, u rasponu od 73,64 za ljutu papriku do 74,28 za kajensku. Tretiranjem uzoraka PEP-om, dolazi do pada svjetline uzoraka, te je najveća razlika u svjetlini uzoraka vidljiva u uzorku slatke paprike, gdje je tretmanom jakosti 7,5 kV/cm kroz 3 minute došlo do pada *L* vrijednosti na 20,72. Najmanja promjena svjetline boje izmjerena je kod ljute paprike,

gdje nativni uzorak ima vrijednost 73,64, a uzorak tretiran 1 minutu i 2 kV/cm ima vrijednost 60,14.

Za parametar *a* dolazi do porasta u svim tretiranim uzorcima u odnosu na native, osim slatke paprike koja zadržava nižu vrijednost koja iznosi 26,59 pri tretmanu od 7,5 kV/cm te 3 minute. S obzirom na to da parametar *a* predstavlja spektar od -60 (zelena) do 60 (crvena), povećanjem vrijednosti nakon tretmana dolazi do pojačavanja crvenog obojenja u uzorcima, što se objašnjava otpuštanjem pigmenata iz uzoraka paprike tretiranjem PEP-om.

Parametar *b* ukazuje na spektar boja između žute i plave boje, gdje veća vrijednost označava veću izraženost žutog dijela spektra. U svim uzorcima dolazi do pada izraženosti žutog dijela spektra.

Vrijednost *C* (*ab*) predstavlja intenzitet, odnosno zasićenost boje, te se računa kao kvadratni korijen zbroja kvadrata *a* i *b* vrijednosti. Vidljivo je da intenzitet boje opada nakon tretmana nativnog uzorka PEP-om, prilikom čega ljuta paprika tretirana pri 2,0 kV/cm i 1 minuti jedina zadržava ekvivalentan intenzitet početnom.

Delta E ( $\Delta E$ ) predstavlja ukupnu razliku obojenosti skladištenih uzoraka u odnosu na početni uzorak. Prema tome je vidljivo odstupanje boje od nativnih uzoraka, koje je najviše izraženo u slatkoj paprici, a manje u kajenskoj i ljutoj paprici.

#### 4.2.3. Određivanje udjela fenola nakon tretiranja PEP-om

Prethodno je utvrđeno da tretiranjem biljnog materijala pulsirajućim električnim poljem dolazi do netermičke elektroplazmolize biljnog materijala, što rezultira u povećanoj permeabilnosti stanične stijenke. Time se omogućuje veći prijelaz bioaktivnih komponenti iz biljnih stanica u odabrano otapalo. U tablici 13. prikazan je udio ukupnih fenola u uzorcima paprike.

**Tablica 13.** Maseni udio ukupnih fenola u nativnim uzorcima paprike

Uzorak	Ukupni fenoli (mg/g)
Slatka	0,73±0,007
Ljuta	1,09±0,007
Kajenska	2,17±0,007

Najveći maseni udio fenola je dobiven iz kajenske paprike, te iznosi 2,17 mg/g što je očekivano s obzirom na visoke prethodno pokazane količine fenola i antioksidativnu aktivnost u odnosu na slatku i ljutu papriku.

Nakon tretiranja uzoraka PEP-om, došlo je do povećanja ekstrahiranog udjela fenola u uzorcima, što je u skladu s očekivanjima s obzirom na permeabilizaciju stanične stijenke pod djelovanjem električnog polja. Rezultati su prikazani u tablici 14.

**Tablica 14.** Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	Ukupni fenoli (mg/g)
LJ	2,0	1,0	2,89±0,010
LJ	7,5	1,0	2,51±0,006
LJ	<b>5,0</b>	<b>3,0</b>	<b>1,85±0,010</b>
LJ	5,0	3,0	1,71±0,010
LJ	5,0	3,0	1,65±0,005
LJ	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>1,15±0,007</b>
LJ	7,5	5,0	2,46±0,020
S	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>4,67±0,020</b>
S	2,0	3,0	3,27±0,010
S	7,5	3,0	2,90±0,020
S	5,0	5,0	2,72±0,020
K	5,0	1,0	3,04±0,007
K	2,0	3,0	3,11±0,005
K	7,5	3,0	3,84±0,006
K	5,0	5,0	3,34±0,010

Nakon tretmana uzoraka tri sorte paprike pulsirajućim električnim poljem, vidljivo je da je najveći udio fenola, 4,67 mg/g ekstrahiran u uzorku slatke paprike, u kombinaciji jakosti polja 5 kV/cm kroz trajanje 1 minute. Uzorak ljute paprike koji je tretiran poljem jakosti 2 kV/cm kroz 5 minuta imao je najmanji udio fenola, tek 1,15 mg/g.

Za uzorak ljute paprike, nakon tretmana PEP-om duljine 1 min, dolazi do pada iskorištenja ekstrakcijskog postupka povećanjem jakosti električnog polja s 2 na 7,5 kV/cm, odnosno dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola s 2,89 mg/g na 2,51 mg/g. Dobiveni rezultati su u skladu sa Sotelo i sur. (2018) koji su prijavili da povećanje intenziteta PEP-a

smanjuje koncentraciju fenola. Prilikom primjene jakosti polja od 2 kV/cm, produljenjem vremena tretmana s 1 na 5 minuta, udio fenolnih spojeva u ekstraktima se smanjuje. Smanjenje udjela fenola zapaženo nakon tretiranja PEP-om sugerira da bi narušavanje stanične stijenke moglo pogodovati kontaktu između oslobođenih fenolnih tvari i oksidativnih enzima, poput polifenol oksidaze ili peroksidaze, čime se smanjuje njihov mjerljivi udio (Lopez-Gamez i sur., 2021).

Trend opadanja koncentracije fenola s duljinom vremena tretiranja vidljiv je i kod slatke paprike, gdje uzorak tretiran s 5 kV/cm kroz 1 min ima i najveći udio fenola od 4,67 mg/g, dok nakon 5 minuta iznosi 2,72 mg/g. Također, ako usporedimo tretman dug 3 minute, vidljiv je pad fenolnih spojeva povećanjem jakosti električnog polja s 2 na 7,5 kV/cm.

U uzorku kajenske paprike, s najvećim udjelom ukupnih fenola određenih spektrofotometrijski (tablica 14), produljenjem vremena tretiranja pri 5 kV/cm dolazi do porasta udjela fenolnih spojeva s 3,04 na 3,34 mg/g. Također, povećanjem jakosti polja prilikom trominutnog tretmana dolazi do porasta udjela fenola s 3,11 na 3,34 mg/g.

#### 4.2.4. Određivanje udjela antioksidativnosti nakon tretmana PEP-om

Antioksidativna aktivnost uzoraka paprike ispitana je DPPH metodom, te su rezultati izraženi u tablici 15. kao postotak redukcije DPPH radikala.

**Tablica 15.** Prikaz vrijednosti antioksidativne aktivnosti u nativnim uzorcima paprike

<b>Uzorak</b>	<b>Redukcija (%)</b>
<b>Slatka</b>	61,29±0,10
<b>Ljuta</b>	41,56±0,08
<b>Kajenska</b>	57,01±0,08

Postotak redukcije DPPH radikala najveći je u uzorku slatke paprike, što nije usporedivo s udjelom fenola u nativnim uzorcima s obzirom na to da su imali najnižu vrijednost

od 0,73 mg/g. Međutim, bitno je istaknuti da svi fenolni spojevi ne reagiraju s DPPH radikalom, te postoje i drugi spojevi koji doprinose antioksidativnoj aktivnosti.

Nakon tretmana PEP-om, određen je postotak redukcije DPPH metodom, te su rezultati prikazani u tablici 16.

**Tablica 16.** . Prikaz vrijednosti antioksidativne aktivnosti u uzorcima paprike nakon tretiranja pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	Redukcija (%)
LJ	2,0	1,0	75,12±0,20
LJ	7,5	1,0	67,97±0,18
LJ	5,0	3,0	81,70±0,10
LJ	5,0	3,0	74,83±0,10
LJ	5,0	3,0	81,03±0,10
LJ	2,0	5,0	<b>64,73±0,06</b>
LJ	7,5	5,0	66,35±0,09
S	5,0	1,0	95,14±0,10
S	2,0	3,0	<b>97,52±0,15</b>
S	7,5	3,0	94,00±0,15
S	5,0	5,0	95,52±0,15
K	5,0	1,0	84,56±0,17
K	2,0	3,0	79,12±0,25
K	7,5	3,0	86,85±0,12
K	5,0	5,0	<b>93,90±0,12</b>

Najveći postotak redukcije (97,52 %) izmjeren je u uzorku slatke paprike koja je tretirana 3 minute te jakosti električnog polja 2 kV/cm, dok se najveći udio fenola nalazi u uzorku tretiranom s jakošću polja 5 kV/cm tijekom 1 minute. Smanjenjem vremena tretiranja vidljiv je i pad antioksidacijske aktivnosti, gdje postotak redukcije iznosi 95,14 %.

Postotak redukcije od 64,73 %, najniži je od izmjerenih i to kod ljute paprike, nakon tretmana PEP-om jakosti 2 kV/cm kroz 5 minuta. Također, najmanji udio fenola izmjeren je u

istom uzorku, s manjim udjelom fenola dolazi i do manje antioksidacijske aktivnosti. Povećanjem jakosti na 7,5 kV/cm dolazi do neznatnog porasta postotka redukcije.

U uzorcima kajenske paprike najveći postotak redukcije (93,90 %) izmjeren je nakon tretmana od 5 minuta te jakosti polja od 5 kV/cm. Smanjenjem vremena tretiranja dolazi do pada postotka redukcije.

#### 4.2.5. Određivanje udjela kapsaicina i dihidrokapsaicina u uzorcima paprike nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem HPLC-UV metodom.

Udio kapsaicina i dihidrokapsaicina u uzorcima paprike određen je HPLC-UV metodom nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem. Određen je maseni udio kapsaicina i dihidrokapsaicina u nativnim uzorcima paprike u metanolu, te su rezultati prikazani u tablici 17.

**Tablica 17.** Udio kapsaicina i dihidrokapsaicina u nativnim uzorcima paprike

<b>Uzorak</b>	<b>Maseni udio (mg/g) - kapsaicin</b>
<b>Slatka</b>	0,07±0,001
<b>Ljuta</b>	0,06±0,010
<b>Kajenska</b>	<b>0,10±0,002</b>
<b>Uzorak</b>	<b>Maseni udio (mg/g) - dihidrokapsaicin</b>
<b>Slatka</b>	n.d.
<b>Ljuta</b>	0,02±0,001
<b>Kajenska</b>	0,02±0,007

\*n.d. – nije detektirano

Kapsaicin je detektiran u uzorku kajenske paprike u najvećoj koncentraciji, te mu maseni udio iznosi 0,10 mg/g, što je za očekivati s obzirom na to da se radi o sorti bogatoj kapsaicinom. Dihidro-kapsaicin nije detektiran u slatkoj paprici, dok ljuta i kajenska paprika sadrže istu količinu dihidrokapsaicina u iznosu od 0,02 mg/g.

Nakon tretiranja PEP-om određene su koncentracija kapsaicina HPLC-UV metodom, te su rezultati prikazani u tablici 18.

**Tablica 18.** Udjeli kapsaicina u uzorcima paprike nakon tretiranja pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	mg/g
LJ	2,0	1,0	0,16±0,001
LJ	7,5	1,0	0,19±0,007
LJ	<b>5,0</b>	<b>3,0</b>	<b>0,21±0,012</b>
LJ	5,0	3,0	0,20±0,100
LJ	5,0	3,0	0,19±0,070
LJ	2,0	5,0	0,20±0,010
LJ	7,5	5,0	0,20±0,000
S	5,0	1,0	0,17±0,020
S	2,0	3,0	0,18±0,000
S	7,5	3,0	0,19±0,000
S	5,0	5,0	<b>0,19±0,000</b>
K	5,0	1,0	0,31±0,040
K	2,0	3,0	0,28±0,120
K	7,5	3,0	0,27±0,030
K	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>0,32±0,010</b>

**Tablica 19.** Udjeli dihidrokapsaicina u uzorcima paprike nakon tretiranja pulsirajućim električnim poljem

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	mg/g
LJ	2,0	1,0	0,05±0,000
LJ	7,5	1,0	0,05±0,002
LJ	5,0	3,0	n.d.
LJ	5,0	3,0	n.d.
LJ	5,0	3,0	n.d.
LJ	2,0	5,0	n.d.
LJ	7,5	5,0	n.d.
S	5,0	1,0	0,02±0,001
S	2,0	3,0	0,02±0,001
S	7,5	3,0	0,02±0,003
S	5,0	5,0	<b>0,10±0,021</b>
K	5,0	1,0	0,10±0,047

\*n.d. – nije detektirano



**Tablica 19.** Udjeli dihidrokapsaicina u uzorcima paprike nakon tretiranja pulsirajućim električnim poljem-nastavak

Uzorak	Jakost (kV/cm)	t (min)	mg/g
K	2,0	3,0	0,11±0,001
K	7,5	3,0	0,10±0,001
K	5,0	5,0	0,11±0,170

Najviši udio kapsaicina te dihidrokapsaicina zabilježen je u kajenskoj paprici s rezultatom od 0,32 mg/g kapsaicina te 0,11 mg/g dihidrokapsaicina (tablica 18). Ista te ujedno najveća koncentracija dihidrokapsaicina (0,11 mg/g) zabilježena je pri različitom vremenu trajanja procesa te jakosti polja (2 kV/cm i 3 minute te 5,0 kV/cm i 5 minuta) za kajensku papriku (tablica 19). Za razliku od kapsaicina, dihidrokapsaicin unutar ljute paprike nije detektiran, dok najveći udio kod kapsaicina iznosi 0,21 mg/g. Pri jakosti polja od 5 kV/cm te 5 minuta tretiranja kod slatke paprike određen je najveći udio kapsaicina (0,19 mg/g) i dihidrokapsaicina (0,10 mg/g).

**Tablica 20.** Analiza varijance parametara pulsirajućeg električnog polja (A: jakost električnog polja, B: vrijeme, C: uzorak) na ekstrakciju bioaktivnih tvari

	Ukupni fenoli	Kapsaicin	Dihidro-kapsaicin	DPPH
	p	p	p	p
<b>A</b>	0,2040	0,5539	0,9176	0,9286
<b>B</b>	<b>0,0110</b>	0,1412	0,9114	0,4713
<b>C</b>	0,7365	<b>0,0002</b>	<b>0,0365</b>	0,0921
<b>AA</b>	0,3144	0,1537	0,8935	0,0539
<b>BB</b>	0,1010	0,7855	0,2410	0,1127
<b>CC</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0036</b>	<b>0,0165</b>	<b>0,0152</b>
<b>AB</b>	<b>0,0482</b>	0,3988	0,8997	0,3546
<b>AC</b>	0,1726	0,6551	0,8425	0,2500
<b>BC</b>	<b>0,0169</b>	0,7770	0,3309	0,1435

statistička značajnost  $p < 0,05$

Iz analize varijance (tablica 20) vidljivo je da statistički značajan učinak ( $p < 0,05$ ) na ekstrakciju ukupnih fenola nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem ima vrijeme (A), kvadratni utjecaj vrste paprike (uzorak) (CC), utjecaj jakosti električnog polja i vremena (AB) te utjecaj vremena i vrste paprike (uzorak) (BC). Statistički značajan utjecaj na ekstrakciju kapsaicina i dihidrokapsaicina pokazao se utjecaj vrste paprike (uzorak) (C) te kvadratni utjecaj

vrste paprike (uzorka) (CC). Na antioksidativni kapacitet statistički značajan utjecaj imao je kvadratni utjecaj vrste paprike (uzorak) (CC).

**Tablica 21.** Statistički parametri regresije

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Standardna pogreška</b>
<b>Ukupni fenoli</b>	95,58	0,32
<b>Kapsaicin</b>	96,19	0,02
<b>Dihidrokapisaicin</b>	82,13	0,03
<b>DPPH</b>	87,79	4,62

Tablica 21. prikazuje koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te standardnu pogrešku za svaku ispitivanu varijablu. R-kvadratna vrijednost prikazuje varijabilnost u iznosu od 95,58 % za ukupne fenole, 96,19 % za kapsaicin, 82,13 % za dihidrokapisaicin te 87,79 % za antioksidativni kapacitet.

Ukupni dobiveni rezultati pokazuju porast bioaktivnih tvari primjenom pulsirajućeg električnog polja iz različitih sorti paprika te su u skladu s rezultatima Rybak i sur. (2020) koji također bilježe rast sadržaja određenih polarnih i nepolarnih bioaktivnih spojeva. Primjena PEP tretmana značajno utječe na prinose ekstrakcije (Naliyadhara i sur, 2022).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Postupak ultrazvučne ekstrakcije pokazao se pogodnim za izolaciju fenolnih spojeva iz različitih uzoraka paprike. Najviši udio fenolnih spojeva određen je u kajenskoj paprici (8,99 mg/g).
2. Ultrazvučni ekstrakti različitih sorti paprike u metanolu pokazali su antioksidativnu aktivnost. Postotak redukcije izmjeren je u rasponu od 28,41 do 88,08 %. Najveći postotak redukcije izmjeren je u uzorku paprike Red Fresno (88,08 %).
3. HPLC-UV analizom ultrazvučnih ekstrakata određeno je prisustvo kapsaicina i dihidroksikapsaicina. Najveći pik detektiran je u paprici sorte Bhut Jolokia s koncentracijom 10,25 mg/g. U uzorcima svježe crvene i zelene paprike nisu detektirani kapsaicin i dihidroksikapsaicin.
4. Električna vodljivost uzoraka proporcionalna je jakosti električnog polja i vremenu tretmana. Najveća izmjerena vrijednost električne vodljivosti (1519  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) je u uzorku kajenske paprike koji je tretiran 5 minuta pri jakosti električnog polja 5 kV/cm.
5. Prilikom predtretmana uzoraka PEP-om, najveći udio fenola određen je u uzorku tretiranom električnim poljem jakosti 5 kV/cm tijekom 1 minute, te je njihov udio iznosio 4,67 mg/g.
6. Najveća redukcija DPPH slobodnih radikala u uzorcima tretiranim PEP-om postignuta je s tretmanom jakosti 2 kV/cm kroz 3 minute na uzorku slatke paprike, te je postotak redukcije iznosio 97,52 %.
7. Najveći udio kapsaicina (0,32 mg/g) pri tretmanu 5 kV/cm kroz 5 minuta i dihidrokapsaicina (0,11 mg/g) pri tretmanu 2 kV/cm kroz 3 minute i 5 kV/cm kroz 5 minuta, određen je u kajenskoj paprici.

## 6. LITERATURA

- Akdemir Evrendilek G, Bulut N, Atmaca B, Uzuner S (2022) Prediction of *Aspergillus parasiticus* inhibition and aflatoxin mitigation in red pepper flakes treated by pulsed electric field treatment using machine learning and neural networks. *Food Res Int* **162**, 111954. doi:[10.1016/j.foodres.2022.111954](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111954)
- Arimboor R, Natarajan RB, Menon KR, Chandrasekhar LP, Moorkoth V (2015) Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. *J Food Sci Technol* **52**, 1258–1271. doi:[10.1007/s13197-014-1260-7](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1260-7)
- Bae H, Jayaprakasha GK, Jifon J, Patil BS (2012) Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chem* **130**, 751–758. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.07.041](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.041)
- Baenas N, Belović M, Ilic N, Morena DA, Garcia – Viguera C (2018) Industrial use of peppe (*Capsicum annum* L.) derived procutcs: technological benefits and biological advantages. *Food Chem* **274**, 872 – 885. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.0470>
- Baker CJ, Smith JM, Yarberry AJ, Rice C (2020) Induction of apoplast phenolics in pepper (*Capsicum annum*) leaves in response to pathogenic bacteria. *Physiol Mol Plant Pathol* **109**, 101453. doi:[10.1016/j.pmpp.2019.101453](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101453)
- Barbero G, Liazid A, Palma M, Barroso C (2008) Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **75**, 1332–1337. doi:[10.1016/j.talanta.2008.01.046](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.046)
- Batiha GE-S, Alqahtani A, Ojo OA, Shaheen HM, Wasef L, Elzeiny M i sur. (2020) Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum spp.* and Capsaicinoids. *IJMS* **21**, 5179. doi:[10.3390/ijms21155179](https://doi.org/10.3390/ijms21155179)
- Bhardwaj SK, Dwivedi K, Agarwal DD (2015) A Review: HPLC Method Development and Validation. *Int J Anal Bioanal Chem* **5**, 76 – 81. doi: [10.26479/2017.0206.12](https://doi.org/10.26479/2017.0206.12)
- Blanco – Rios A, Medina – Juarez LA, Gonzales Aguilar GA, Gamez – Meza N (2013) Antioxidant Activity of the Phenolic and Oily Fractions od Different Sweet Bell Pepper. *J Mex Chem Soc* **57**, 137 – 143. doi: <https://doi.org/10.29356/jmcs.v57i2.226>
- Bocker R, Silva EK (2022) Pulsed electric field assisted extraction of natural food pigments and colorings from plant matrices. *Food Chem* **15**, 100398. doi:[10.1016/j.fochx.2022.100398](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100398)
- Bravo L (2009) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* **56**, 317–333. doi:[10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x)
- Castro SM, Saraiva JA, Lopes-da-Silva JA, Delgadillo I, Loey AV, Smout C i sur. (2008) Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (*Capsicum annum* L.). *Food Chem* **107**, 1436–1449. doi:[10.1016/j.foodchem.2007.09.074](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.074)
- Chávez-Mendoza C, Sanchez E, Muñoz-Marquez E, Sida-Arreola J, Flores-Cordova M (2015) Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Grafted Varieties of Bell Pepper *Antioxid* **4**, 427–446. doi:[10.3390/antiox4020427](https://doi.org/10.3390/antiox4020427)
- Chemat F, Huma Z, Khan MK (2011) Application of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem* **18**, 813 – 835. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Çınar M, Alım B, Alım Z, Şakar E (2023) Determination of the molecular structure and spectroscopic properties of capsaicin. *Radiat Phys Chem* **208**, 110879. doi:[10.1016/j.radphyschem.2023.110879](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2023.110879)

- Cocan I, Negrea M, Cozma A, Alexa E, Poiana M-A, Raba D i sur. (2021) Chili and Sweet Pepper Seed Oil Used as a Natural Antioxidant to Improve the Thermo-Oxidative Stability of Sunflower Oil. *Agron* **11**, 2579. doi:[10.3390/agronomy11122579](https://doi.org/10.3390/agronomy11122579)
- Conforti F, Statti GA, Menichini F (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chem* **102**, 1096–1104. doi:[10.1016/j.foodchem.2006.06.047](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.047)
- Dawidowicz AL, Wianowska D, Olszowy M (2012) On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chem* **131**, 1037–1043. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.09.067](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067)
- Deeth HC, Datta N, Ross AIV, Dam XT (2007) Pulsed Electric Field Technology: Effect on Milk and Fruit Juices. U: Tewari G, Juneja K.V (ured.) In *Advances in Thermal and Non - Thermal Food Preservation*, 1. izd., Blackwell Publishing, Iowa/Oxford/Victoria, str. 241–269.
- Deng S, Rong H, Tu H, Zheng B, Mu X, Zhu L i sur. (2019) Molecular basis of neurophysiological and antioxidant roles of Szechuan pepper. *Biomed Pharmacother* **112**, 108696. doi:[10.1016/j.biopha.2019.108696](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108696)
- Díaz J, Pomar F, Bernal A, Merino F (2004) Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochem Rev* **3**, 141–157. doi:[10.1023/B:PHYT.0000047801.41574.6e](https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047801.41574.6e)
- Dippong T, Senila L, Muresan LE (2023) Preparation and Characterization of the Composition of Volatile Compounds, Fatty Acids and Thermal Behavior of Paprika. *Foods* **12**, 204. doi:[10.3390/foods12102041](https://doi.org/10.3390/foods12102041)
- Fattorusso E, Tagliatela - Scafati O (2007) *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, 1. izd., Wiley, str. 305 - 337
- Frosina Babanovska-Milenkovska, Ljubica Karakasova, Biljana Petanovska-Ilievska, Silvana Manasievska-Simic, Elizabeta Miskoska-Milevska, Lence Velkoska-Markovska i sur. (2016) CHANGE IN THE QUALITY PROPERTIES OF TWO DIFFERENT PEPPER VARIETIES IN FRESH AND DRIED CONDITION. *J Int Sci Publ* **4**, 250 – 259.
- Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés MS, Abadía J, Gil-Ortega R, Álvarez-Fernández A (2006) Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruits by Liquid Chromatography–Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **54**, 9303–9311. doi:[10.1021/jf0620261](https://doi.org/10.1021/jf0620261)
- Guijarro-Real C, Adalid-Martínez AM, Pires CK, Ribes-Moya AM, Fita A, Rodríguez-Burruezo A (2023) The Effect of the Varietal Type, Ripening Stage, and Growing Conditions on the Content and Profile of Sugars and Capsaicinoids in *Capsicum* Peppers. *Plants* **12**, 231. doi:[10.3390/plants12020231](https://doi.org/10.3390/plants12020231)
- Guil-Guerrero JL, Martínez-Guirado C, Del Mar Reboloso-Fuentes M, Carrique-Pérez A (2006) Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *Eur Food Res Technol* **224**, 1–9. doi:[10.1007/s00217-006-0281-5](https://doi.org/10.1007/s00217-006-0281-5)
- Heidmann I, Boutilier K (2015) Pepper, Sweet (*Capsicum annuum*). In *Agrobacterium Protocols*, 1. izd., Springer, New York, str. 321–334.
- Herrera-Pool E, Ramos-Díaz AL, Lizardi-Jiménez MA, Pech-Cohuo S, Ayora-Talavera T, Cuevas-Bernardino JC i sur. (2021) Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. *Ultrason Sonochem* **76**, 105658. doi:[10.1016/j.ultsonch.2021.105658](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105658)

- Jalili F, Jafari SM, Emam-Djomeh Z, Malekjani N, Farzaneh V (2018) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Canola Seeds with the Use of Response Surface Methodology. *Food Anal Method* **11**, 598–612. doi:[10.1007/s12161-017-1030-z](https://doi.org/10.1007/s12161-017-1030-z)
- Jeong K-J, Seo J-K, Ahamed Z, Su Lee Y, Yang H-S (2023) Paprika extract as a natural antioxidant in cold-stored pork patties: Effect on oxidative stability and heterocyclic amines inhibition. *Food Chem* **20**, 100936. doi:[10.1016/j.fochx.2023.100936](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100936)
- Jeong WY, Jin JS, Cho YA, Lee JH, Park S, Jeong SW (2011) Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *J Sep Sci* **34**, 2967–2974. doi:[10.1002/jssc.201100524](https://doi.org/10.1002/jssc.201100524)
- Vinković T, Gluščić V, Mendaš G, Vinković Vrček I, Parađiković N, Tkalec M i sur. (2018) Phytochemical composition of ground paprika from the eastern Danube region. *Poljoprivreda* **24**, 3–12. doi:[10.18047/poljo.24.2.1](https://doi.org/10.18047/poljo.24.2.1)
- Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412–422. doi:[10.1007/s13197-011-0251-1](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1)
- Korkmaz A, Hayaloglu AA, Atasoy AF (2017) Evaluation of the volatile compounds of fresh ripened *Capsicum annuum* and its spice pepper (dried red pepper flakes and isot). *LWT* **84**, 842-850. doi:[10.1016/j.lwt.2017.06.058](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.058)
- Kumar K, Debnath P, Singh S, Kumar N (2023) An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. *Stresses* **3**, 570–585. doi:[10.3390/stresses3030040](https://doi.org/10.3390/stresses3030040)
- Lee C-D, Uy NP, Kim C, Kweon O, Lee S, Lee S (2024) HPLC/UV quantitative analysis of capsaicinoids: insights into antioxidant potential of various *Capsicum* cultivars. *JABC* **67**, 14. doi:[10.3839/jabc.2024.014](https://doi.org/10.3839/jabc.2024.014)
- Lee SG, Kim SK, Lee HJ, Lee HS, Lee JH (2018) Impact of moderate and extreme climate change scenarios on growth, morphological features, photosynthesis, and fruit production of hot pepper. *Ecol Evol* **8**, 197–206. doi:[10.1002/ece3.3647](https://doi.org/10.1002/ece3.3647)
- Liu C, Luo S, Zhao Y, Miao Y, Wang Q, Ye L i sur. (2022) Multiomics analyses reveal high temperature-induced molecular regulation of ascorbic acid and capsaicin biosynthesis in pepper fruits. *Environ Exp Bot* **201**, 104941. doi:[10.1016/j.envexpbot.2022.104941](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104941)
- López-Gámez G, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R (2021) Pulsed electric field treatment strategies to increase bioaccessibility of phenolic and carotenoid compounds in oil-added carrot purees. *Food Chem* **364**, 130377. doi:[10.1016/j.foodchem.2021.130377](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130377)
- Luo X-J, Peng J, Li Y-J (2011) Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur J Pharmacol* **650**, 1–7. doi:[10.1016/j.ejphar.2010.09.074](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074).
- Machado FB, Lopes De Macêdo IY, Campos HM, Gonçalves Moreno EK, Batista Silva MF, Raimundo De Oliveira Neto J i sur. (2021) Antioxidant activity of thirty-six peppers varieties and vasorelaxant of selected varieties. *Food Biosci* **41**, 100989. doi:[10.1016/j.fbio.2021.100989](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100989).
- Materska M, Perucka I (2005) Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* **53**, 1750–1756. doi:[10.1021/jf035331k](https://doi.org/10.1021/jf035331k)
- Mihoci M (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Kem Ind* **64**, 681-694.

- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* **130**, 1036–1043. doi:[10.1016/j.foodchem.2011.07.127](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127)
- Morren J, Roodenburg B, De Haan SWH (2003) Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. *IFSET* **4**, 285–295. doi:[10.1016/S1466-8564\(03\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00041-9)
- Naliyadhara N, Kumar A, Girisa S, Daimary UD, Hegde M, Kunnumakkara AB (2022) Pulsed electric field (PEF): Avant-garde extraction escalation technology in food industry. *Trends Food Sci* **122**, 238–255. doi:[10.1016/j.tifs.2022.02.019](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.019)
- Nowosad K, Sujka M, Pankiewicz U, Kowalski R (2021) The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J Food Sci Technol* **58**, 397–411. doi:[10.1007/s13197-020-04512-4](https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4)
- Othman Z.A.A, Ahmed Y.B.H, Habila M.A, Ghafar A.A (2011) Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecul* **16**, 8919–8929. doi: [10.3390/molecules16108919](https://doi.org/10.3390/molecules16108919)
- Palma MJ, Teran F, Contreras-Ruiz A, Rodriguez-Ruiz M, Corpas FJ (2020) Antioxidant Profile of Pepper (*Capsicum annum* L.) Fruits Containing Diverse Level of Capsaicinoids. *Antioxid in Food* **9**, 878. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9090878>
- Pavlović N, Jakovljević M, Molnar M, Jokić (2021) S ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM COCOA BEAN SHELL. *Food Health Dis* **10**, 77 – 88.
- Plank DW, Szpylka J, Sapirstein H, Woollard D, Zapf CM i sur. (2012) Determination of Antioxidant Activity in Foods and Beverages by Reaction with 2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative Study First Action 2012.04. *J AOAC Int* **95**, 1562–1569. doi:[10.5740/jaoacint.CS2012\\_04](https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2012_04).
- Ribes - Moya AM, Adalid AM, Raigón MD, Hellín P, Fita A, Rodríguez - Burruezo A (2020) Variation in flavonoids in a collection of peppers (*Capsicum* sp.) under organic and conventional cultivation: effect of the genotype, ripening stage, and growing system. *J Sci Food Agric* **10**, 2208–2223. doi:[10.1002/jsfa.10245](https://doi.org/10.1002/jsfa.10245).
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**, 933–956. doi:[10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
- Rybak K, Samborska K, Jedlinska A, Parniakov O, Nowacka M, Witrowa-Rajchert i sur. (2020) The impact of pulsed electric field pretreatment of bell pepper on the selected properties of spray dried juice. *IFSET*, **65**, 102446. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102446>
- Sim KH, Sil HY (2008) Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annum*) pericarp and seed extract. *Int J of Food Sci Tech* **43**, 1813 – 1823. doi: [10.1111/j.1365-2621.2008.01715.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01715.x)
- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828 – 834. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Sora GTS, Haminiuk CW, Da Silvka MV, Zielinski AA, Goncalves GA, Bracht A. i sur. (2015) A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro



- antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. *J Food Sci Technol* **52**, 8086 – 8094. doi: [10.1007/s13197-015-1935-8](https://doi.org/10.1007/s13197-015-1935-8)
- Sotelo KAG, Hamid N, Oey I, Pook C, Gutierrez-Maddox N, Ma Q, Ying Leong S, Lu J (2018) Red cherries (*Prunus avium* var. *Stella*) processed by pulsed electric field – Physical, chemical and microbiological analyses. *Food Chem* **240**, 926–934. doi:[10.1016/j.foodchem.2017.08.017](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.017)
- Srinivasan K (2016) Biological Activities of Red Pepper ( *Capsicum annum* ) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critl Rev Food Sci Nutr* **56**, 1488–1500. doi:[10.1080/10408398.2013.772090](https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772090)
- Sticker M, Orenge M (1995) Similarity of Color Images Survival Dana: An Alternative to Change-Point Models. Proceedings of SPIE Conference on Storage and Retrieval for Image and Video Databases III, **2420**, 381-392. doi: <http://dx.doi.org/10.1117/12.205308>
- Sukrasno N, Yeoman MM (1993) Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochem* **32**, 839–844. doi:[10.1016/0031-9422\(93\)85217-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85217-F)
- Sun T, Xu Z, Wu CT, Janes M, Prinyawiwatkul W, No HK (2007) Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annum* L.). *J Food Sci* **72**, 98 – 102. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>
- Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal Chem* **71**, 100 – 109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Toepfl S, Siemer C, Heinz V (2014) Effect of High-Intensity Electric Field Pulses on Solid Foods, 2. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 147–154.
- Tsong TY (1990) On electroporation of cell membranes and some related phenomena. *J Electroanal Chem Interfac Electrochem* **299**, 271–295. doi:[10.1016/0022-0728\(90\)87529-S](https://doi.org/10.1016/0022-0728(90)87529-S)
- Tuladhar P, Sasidharan S, Saudagar P (2021) Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses, 1 izd., Elsevier, Amsterdam, str. 419–441.
- Vázquez-Espinosa M, Fayos O, V. González-de-Peredo A, Espada-Bellido E, Ferreiro-González M, Palma M i sur. (2020) Content of Capsaicinoids and Capsiate in “Filius” Pepper Varieties as Affected by Ripening. *Plants* **9**, 1222. doi:[10.3390/plants9091222](https://doi.org/10.3390/plants9091222)
- Vinatoru M (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* **8**, 303 – 313. doi: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Wang L, Boussetta N, Lebovka N, Vorobiev E (2020) Cell disintegration of apple peels induced by pulsed electric field and efficiency of bio-compound extraction. *Food Bioprod Process* **122**, 13–21. doi:[10.1016/j.fbp.2020.03.004](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.004)
- Wang L, Zhong Y, Liu J, Ma R, Miao Y, Chen W, Zheng J, Pang X, Wan H (2023) Pigment Biosynthesis and Molecular Genetics of Fruit Color in Pepper. *Plants* **12**, 2156. doi:[10.3390/plants12112156](https://doi.org/10.3390/plants12112156)
- Weaver JC (2000) Electroporation of cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci* **28**, 24–33. doi:[10.1109/27.842820](https://doi.org/10.1109/27.842820).
- Zaki N, Hakmaoui A, Ouattmane A, Fernandez-Trujillo JP (2013) Quality characteristics of Moroccan sweet paprika (*Capsicum annum* L.) at different sampling times. *Food Sci Technol* **33**, 577–585. doi:[10.1590/S0101-20612013005000072](https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000072)



Zeiner M, Fiedler H, Juranović Cindrić I, Nemet I, Toma D, Habinovec I (2023) Preliminary Study of Pepper Types Based on Multielement Content Combined with Chemometrics. *Foods* **12**, 3132. doi:[10.3390/foods12163132](https://doi.org/10.3390/foods12163132)

Zhuang Y, Chen L, Sun L, Cao J (2012) Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *J Funct Foods* **4**, 331–338. doi:[10.1016/j.jff.2012.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.001).

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Anamaria Šimunović 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