

Utjecaj parametara ultrazvučne ekstrakcije na antioksidacijska svojstva ekstrakta lista koprive (Urtica dioica)

Tomeković, Dea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:476819>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Dea Tomeković

UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE
NA ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA LISTA
KOPRIVE (*Urtica dioica*)

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada prihvaćena je na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 24. srpnja 2024.
Mentor: prof. dr. sc. Mirela Planinić

**UTJECAJ PARAMETARA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKA
SVOJSTVA EKSTRAKTA LISTA KOPRIVE (*Urtica dioica*)**
Dea Tomeković, 0113148864

Sažetak:

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja biljka koju čovjek od davnina koristi za prehranu, liječenje i izradu tekstila, a zbog bogatog kemijskog sastava ponovno je u fokusu znanstvenih istraživanja. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj parametara ultrazvukom potpomognute kruto-tekuće ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih tvari i pigmentata u ekstraktu suhog lista koprive te njegovu antioksidacijsku aktivnost. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji pod različitim uvjetima: temperatura ekstrakcije (60 – 80 °C), vrijeme ekstrakcije (5 – 35 min) i udio etanola u voda-etanol otapalu (0 – 100%). Za optimizaciju procesa korišteni su metoda odzivnih površina i Box-Behnken dizajn eksperimenta. Utvrđeno je da je udio etanola u otapalu imao najveći utjecaj na svojstva analiziranog ekstrakta. Nadalje, utvrđeni su različiti optimalni uvjeti za ekstrakciju pigmentata i za ekstrakciju fenolnih spojeva. Ekstrakciji klorofila i karotenoida pogodovala je niža temperatura, dulje vrijeme ekstrakcije te veći udio etanola u otapalu (40 °C, 35 min, 100% etanol), dok je ekstrakcija pri višoj temperaturi uz niži udio etanola u otapalu i kratko vrijeme ekstrakcije (80 °C, 5 min, 43% etanol) rezultiralo ekstraktom s najvećim udjelom ukupnih fenolnih tvari i maksimalnim antioksidativnim djelovanjem. Može se zaključiti da je primijenjena ekstrakcijska metoda učinkovita u izolaciji bioaktivnih spojeva iz lišća koprive, a dobiveni ekstrakt ima potencijal funkcionalnog pripravka.

Ključne riječi: list koprive, ultrazvučna ekstrakcija, polifenoli, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 42 stranica
16 slika
9 tablica
53 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

1. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić	predsjednik
2. prof. dr. sc. Mirela Planinić	član-mentor
3. dr. sc. Gordana Šelo	član
4. prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study Food Engineering

Department of Process Engineering
Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X held on 24 July 2024

Mentor: prof. dr. sc. Mirela Planinić

INFLUENCE OF ULTRASONIC EXTRACTION PARAMETERS ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NETTLE LEAF (*Urtica dioica*) EXTRACT

Dea Tomeković, 0113148864

Summary:

Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) is a perennial plant that has been used by humans since ancient times for nutrition, treatment and the manufacture of textiles. Due to its rich chemical composition, it has once again become the focus of scientific research. The aim of this study was to determine the influence of ultrasound-assisted solid-liquid extraction parameters on the content of bioactive compounds and pigments in the extract of dried nettle leaves and its antioxidant activity. The extraction was carried out in an ultrasonic bath under different conditions: extraction temperature (60 – 80 °C), extraction time (5 – 35 min) and the ethanol content in the water-ethanol solvent (0 – 100%). The Response Surface Method and the Box-Behnken design were used to optimise the process. It was found that the ethanol concentration in the solvent was the process parameter that had the greatest influence on the properties of the analysed extract. Furthermore, different optimal conditions for the extraction of pigments and for the extraction of phenolic compounds were determined. The extraction of chlorophylls and carotenoids was favoured by a lower temperature, a longer extraction time with a higher concentration of ethanol (40 °C, 35 min, 100% ethanol), while extraction at a higher temperature with a lower concentration of ethanol and a short time (80 °C, 5 min, 43% ethanol) resulted in an extract with the highest content of total phenolic substances and maximum antioxidant activity. It can be concluded that the studied extraction method is effective in isolating bioactive compounds from nettle leaves and the obtained extract has the potential of a functional supplement.

Key words: nettle leaf, ultrasonic extraction, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity

Thesis contains: 42 pages
16 figures
9 tables
53 references

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Ana Bucić-Kojić, PhD, prof. | predsjednik |
| 2. Mirela Planinić, PhD, prof. | član-mentor |
| 3. Gordana Šelo, PhD | član |
| 4. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, prof. | zamjena člana |

Datum obrane: 27 September 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA:

27. rujna 2024.

TE OCIJENJEN USPJEHOM:

izvotan (5)

pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić, predsjednik

Ana Bucić-Kojić
(potpis)

2. prof. dr. sc. Mirela Planinić, član - mentor

Mirela Planinić
(potpis)

3. dr. sc. Gordana Šelo, član

Gordana Šelo
(potpis)

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dc. sc. Mireli Planinić na podršci i pomoći tijekom cjelokupnog procesa, što je saslušala moje želje i bila strpljiva u ostvarivanju ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se asistentici dr.sc. Gordani Šelo na velikoj pomoći prilikom provedbe samog eksperimenta u laboratoriju i svih savjeta koje mi je dala.

Hvala i svim ostalim profesorima i asistentima te osoblju Prehrambeno–tehnološkog fakulteta Osijek koji su mi prenijeli znanje i omogućili ovaj veliki korak u životu.

Najveće hvala mojoj obitelji i Ivanu koji su me podupirali kroz ovo dugo vremensko razdoblje i pružili ono najbitnije što je osobi potrebno za uspjeh, ljubav i razumijevanje.

Na kraju, posebno sam zahvalna (na) onima koji su na ovom putu bili ogromna podrška, ali nisu za života dočekali njegov kraj. Ipak, netko to gore vidi sve!

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KOPRIVA.....	4
2.1.1. Botaničko podrijetlo koprive	4
2.1.2. Upotreba koprive	4
2.1.3. Bioaktivne tvari prisutne u koprivi	5
2.2. EKSTRAKCIJA.....	6
2.2.1. Ultrazvuk	7
2.2.2. Primjena ultrazvuka	7
2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. ZADATAK	10
3.2. MATERIJALI.....	10
3.2.2. Uređaji	11
3.2.3. Kemikalije	11
3.3. METODE RADA	12
3.3.1. Priprema uzorka.....	14
3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	14
3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari.....	15
3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida	16
3.3.5. Određivanje klorofila a i b te ukupnih karotenoida.....	16
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta	17
3.3.7. Refraktometrijsko određivanje koncentracije otopljenih tvari u ekstraktu	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST BIOAKTIVNIH TVARI IZ LISTA KOPRIVE.....	22
4.2. MEĐUSOBNA POVEZANOST KONCENTRACIJE FENOLNIH TVARI, PIGMENATA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U EKSTRAKTU	31
4.3. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE	32
4.4. USPOREDBA SVOJSTAVA EKSTRAKTA I VODENE INFUZIJE LISTA KOPRIVE.....	33
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	38

Popis oznaka, kratica i simbola

A_{470}	apsorbancija pri valnoj duljini od 470 nm
A_{649}	apsorbancija pri valnoj duljini od 649 nm
A_{664}	apsorbancija pri valnoj duljini od 664 nm
AA	antioksidacijska aktivnost
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
CE	ekvivalent katehina (<i>Catechin Equivalents</i>)
Ch-a	klorofil a
Ch-b	klorofil b
df	stupanj slobode
DPPH	2,2,-difenil-1-prkrilhidrazil radikal
F	Fisherov koeficijent
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GAE	ekvivalent galne kiseline (<i>Gallic Acid Equivalents</i>)
MS	varijanca
OPP	optimalni uvjeti ekstrakcije
R	korelacijski koeficijent
R^2	koeficijent multiple determinacije
RSM	metoda odzivnih površina (<i>Response Surface Method</i>)
SS	suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti
T	temperatura (°C)
t	vrijeme (min)
TC	ukupni karotenoidi (<i>Total Carotenoids</i>)
TE	ekvivalent troloksa (<i>Trolox Equivalents</i>)
TF	ukupni flavonoidi (<i>Total Flavonoids</i>)
TPC	ukupne fenolne tvari (<i>Total Phenolics Content</i>)
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>)

φ	udio 96 %-tnog etanola u otapalu (% v/v)
-----------	--

k	kontrolni uzorak
s.t.	suha tvar uzorka
uz	uzorak

1. UVOD

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljaka postala je ključna tema u području biotehnologije i farmacije zbog velikog potencijala za primjenu u medicini, prehrambenoj industriji i kozmetici. Kopriva (*Urtica dioica*) se često koristi zbog svojih ljekovitih svojstava. Tijekom povijesti, korištena je za liječenje raznih tegoba kao što su artritis i anemija (Bisht i Bhandari, 2018).

Metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz koprive su se razvijale s ciljem povećanja učinkovitosti i čistoće dobivenih ekstrakata. Među modernim tehnikama, ultrazvučna ekstrakcija se ističe kao visoko učinkovita metoda. Ultrazvučna ekstrakcija koristi visokofrekventne zvučne valove za razbijanje staničnih stijenki i oslobađanje bioaktivnih spojeva u otapalo. U slučaju koprive, metoda može učinkovito osloboditi fenolne spojeve, flavonoide, vitamine i minerale koji doprinose njenim ljekovitim svojstvima (Chemat i sur., 2017).

Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja naprednu tehniku za izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala poput koprive pomoću kavitacije koja je rezultat zvučnih valova. Ova metoda nudi brojne prednosti, uključujući visoku učinkovitost, kraće vrijeme obrade i smanjenu potrošnju otapala, čime postaje ekološki i ekonomski održiva opcija (Soria i Villamiel, 2010). Ultrazvuk i njegova primjena tijekom ekstrakcije koprive omogućava dobivanje ekstrakata bogatih fenolnim spojevima i flavonoidima, koji imaju potencijalnu primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Zeković i sur., 2018).

Ovaj diplomski rad, kao i sva sljedeća istraživanja mogu dodatno doprinijeti učinkovitosti i primjeni ultrazvučne ekstrakcije u prehrambenoj industriji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA

2.1.1. Botaničko podrijetlo koprive

Kopriva (Slika 1.) je biljka latinskog naziva *Urtica dioica* L. koja pripada u porodicu *Urticaceae* i rodu *Urtica* (Orčić i sur., 2014). Porodica *Urticaceae* obuhvaća različite drvenaste te jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, uključujući 40 rodova s oko 700 vrsta. Rod *Urtica* sam po sebi sadrži 50 različitih vrsta i podvrsta (Hulina, 2011), većinom prisutnih u tropskim područjima.



Slika 1. Kopriva (*Urtica dioica*)

Zbog toga što raste kao korov široko je rasprostranjena, što je čini vrlo dostupnim i ekonomičnim resursom za potrošače. Dijelovi biljke su korijen, stabljika i listovi, od čega su listovi najcjjenjeniji dio. Na površini listova i stabljika nalaze se trihomi, čiji tekući sadržaj može izazvati lokalnu iritaciju koja uzrokuje crvenilo i peckanje kože. Sastojci tekućine koja uzrokuje iritaciju uključuju acetilkolin, histamin, serotonin i mravlja kiselina (Kregiel i sur., 2018).

2.1.2. Upotreba koprive

Kopriva je bogat izvor raznih bioaktivnih molekula (polifenola, fitosterola, pigmenta, vitamina i minerala), zbog čega ima veliku primjenu u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te narodnoj medicini. U proizvodnji kozmetike uglavnom se koristi prilikom proizvodnja različitih krema, šampona i tinktura protiv opadanja kose ili prilikom liječenja akni. Može se koristiti kao dodatak prilikom pripreme mnogih jela, kao što su juhe, salate, kruh, čokolade čime se dodatno naglašava njezina multifunkcionalnost i prehrambena vrijednost (Upton, 2013; Di Virgilio i sur., 2015). U ekološkoj poljoprivredi, posebno u Španjolskoj, kopriva se koristi kao prirodno gnojivo koje smanjuje potrebu za pesticidima i obogaćuje tlo

mineralima poput dušika (Popescu i sur., 2014; Garmendia i sur., 2018). Također se ističe kao izvor prirodne boje zahvaljujući visokom sadržaju klorofila. Stabljika koprive našla je primjenu i u tekstilnoj industriji zbog svoje čvrstoće, čime pridonosi održivim načinima proizvodnje (Samanta i sur., 2021). Najčešća primjena u medicini je u obliku ekstrakta koji ima antioksidativna i antimikrobna te protuupalna i analgetska svojstva. Zato se upotrebljava kao lijek za anemiju, giht, ekcem, te prilikom liječenja bolesti mokraćnog sustava i sustava za izlučivanje (Orčić i sur. 2014; Di Virgilio i sur., 2015).

2.1.3. Bioaktivne tvari prisutne u koprivi

Polifenoli su skupina prirodnih spojeva prisutnih u raznim biljkama koji nastaju kao rezultat sekundarnog metabolizma. Ovi spojevi su poznati po svojim snažnim antioksidativnim svojstvima koja igraju ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa i slobodnih radikala. Kopriva je bogata različitim vrstama polifenola, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline i lignani, koji pridonose njezinim ljekovitim svojstvima. Istraživanja su pokazala da polifenoli u koprivi mogu imati protuupalna, antimikrobna i antikancerogena svojstva, što je čini vrijednom biljkom u tradicionalnoj medicini (Gülçin i sur., 2004.; Al-Snafi, 2015).

Flavonoidi, poput kvercetina i kemferola, su među najistraživanijim polifenolima u koprivi. Oni ne samo da doprinose antioksidativnom kapacitetu biljke, već također pokazuju sposobnost moduliranja različitih biokemijskih putova povezanih s upalom i imunološkim odgovorom (Anwar i sur., 2007). Fitosteroli su biljni steroli koji su strukturno slični kolesterolu i nalaze se u koprivi. Ovi spojevi igraju značajnu ulogu u ljudskom zdravlju zbog svoje sposobnosti snižavanja razine kolesterola u krvi. Fitosteroli u koprivi, poput beta-sitosterola, kampesterola i stigmasterola, poznati su po svojim korisnim svojstvima, uključujući protuupalno, antikancerogeno djelovanje (Yin i sur., 2009). Beta-sitosterol je najzastupljeniji fitosterol u koprivi i jedan od najviše istraživanih. Studije su pokazale da beta-sitosterol može inhibirati apsorpciju kolesterola u crijevima, što rezultira smanjenjem ukupne razine kolesterola u krvi (Awad i Fink, 2000). Osim toga, beta-sitosterol ima potencijal u liječenju benignih hiperplazija prostate zbog svog antiandrogenog učinka (Wilt i sur., 1999). Kampesterol i stigmasterol, također prisutni, doprinose ljekovitim svojstvima. Istraživanja su pokazala da kampesterol može imati protuupalne i antikancerogene učinke, dok stigmasterol može poboljšati imunološki odgovor i smanjiti upalu (Bouic, 2001).

Fenolne kiseline, poput kafeinske i ferulinske kiseline, također su prisutne u značajnim količinama i doprinose ukupnom antioksidativnom djelovanju koprive (Meyer i sur., 2006).

Osim njih, u koprivi se nalaze i kafeoilimalična (Dar i sur., 2013), ursolna (Ji i sur., 2007) i klorogenska kiselina (Dar i sur., 2013)

Od pigmenata u koprivi, najistaknutiji su klorofili i karotenoidi. Klorofili su zeleni pigmenti odgovorni za fotosintezu u biljkama. U koprivi, klorofili ne samo da omogućuju fotosintetske aktivnosti, već također pokazuju potencijalne zdravstvene benefite kao što su detoksikacija tijela, poboljšanje zdravlja kože i jačanje imunološkog sustava (Ferruzzi i Blakeslee, 2007). Karotenoidi su žuti, narančasti i crveni pigmenti koji se nalaze u koprivi i imaju snažna antioksidativna svojstva. Najznačajniji karotenoidi u koprivi su beta-karoten, lutein i zeaksantin. Beta-karoten je prekursor vitamina A, esencijalnog za zdravlje očiju i kože, dok lutein i zeaksantin igraju ključnu ulogu u zaštiti očiju od štetnih učinaka plavog svjetla i smanjenju rizika od makularne degeneracije (Fraser i Bramley, 2004).

Vitamin C je visoko zastupljen (Carr, 2017), otkuda i potječe antioksidacijsko djelovanje. Uz njega vitamini B kompleksa, A i K (Wang, 2012; Booth, 2009; Kennedy, 2016).

2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je jedna od metoda izolacije spojeva. Koristi se kako bi se iz višekomponentne smjese izdvojila jedna ili više željenih tvari. Temelj metode je u tome da je ciljana tvar topljivija u otapalu nego što je u početnoj smjesi. U osnovi, ekstrakcija se dijeli na kruto-tekuću i tekuće-tekuću ekstrakciju.

Kruto-tekuća ekstrakcija naziva se još i ekstrakcija otapalom, pri tome se prijenos tvari odvija iz krute faze u tekuću. Pojam izluživanje koristi se za ekstrakciju koje se događa kada korišteno otapalo nije lako hlapljivo. Ekstrakcija tekuće-tekuće podrazumijeva prijenos tvari iz jedne tekuće faze u drugu tekuću fazu (Bucić-Kojić, 2008).

Prilikom ekstrakcije aktivnih tvari iz biljnog materijala kao što je kopriva najbolja je ekstrakcija kruto-tekuća gdje se željena komponenta izdvaja iz čvrstog propusnog materijala uz pomoć otapala. Operacija se odvija tako da prvo otapalo prodre u krutu fazu, otopi željenu tvar koja se potom u obliku otopine transportira na površinu krute faze, a zatim i u glavnu masu otopine. Razdvajanjem otopine od krutog uzorka dobiva se ekstrakt koji sadrži ekstrahiranu tvar u otopljenom obliku (Mujić, 2006). Difuzija je mehanizam kojim se odvija prijenos tvari, ona će se odvijati sve dok ne nastupi ravnotežna koncentracija između dvije faze koje su u kontaktu.

2.2.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk, kao tehnologija s visokim potencijalom, našao je široku primjenu u prehrambenoj industriji. Njegova upotreba obuhvaća različite aspekte proizvodnje hrane, od ekstrakcije sastojaka do poboljšanja kvalitete proizvoda. Ova tehnologija koristi visokofrekventne zvučne valove za različite procese, čime se postižu značajni ekonomski i ekološki benefiti (Mason i Lorimer, 2002). Prednosti uporabe ultrazvuka u prehrambenoj industriji su velike: ultrazvučni procesi često zahtijevaju manje energije u usporedbi s konvencionalnim metodama, čime se smanjuje ukupan trošak proizvodnje (Raso i Heinz, 2006), smanjena upotreba kemikalija i niže temperature čine ultrazvuk ekološki prihvatljivijom opcijom za različite procese u prehrambenoj industriji (Chemat i sur., 2011), brži procesi ekstrakcije i obrade hrane mogu povećati ukupnu produktivnost i kapacitet proizvodnje (Mason i Lorimer, 2002). Njegove brojne primjene u ekstrakciji, emulzifikaciji, poboljšanju kvalitete proizvoda te dekontaminaciji i sterilizaciji čine ga nezamjenjivim alatom za modernu proizvodnju hrane.

2.2.2. Primjena ultrazvuka

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Ultrazvuk se često koristi za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. Na primjer, istraživanja su pokazala da ultrazvučna ekstrakcija može povećati prinos flavonoida iz biljaka, smanjujući vrijeme i temperaturu potrebne za proces (Chemat i sur., 2011).

Emulzifikacija. U prehrambenoj industriji, ultrazvuk je učinkovit alat za stvaranje stabilnih emulzija. Visokofrekventni zvučni valovi stvaraju intenzivne sile smicanja koje mogu disperzirati kapljice ulja u vodi, stvarajući homogenu smjesu. Ovaj proces je posebno koristan u proizvodnji prehrambenih proizvoda kao što su umaci i mliječni napitci (McClements, 2005).

Poboljšanje kvalitete proizvoda. Ultrazvuk može poboljšati teksturu i okus prehrambenih proizvoda. Na primjer, korištenje ultrazvuka u procesu mariniranja mesa može smanjiti vrijeme potrebno za postizanje željene arome i mekoće mesa. Ova tehnologija također može smanjiti gubitak težine tijekom kuhanja, što rezultira boljom kvalitetom konačnog proizvoda (Alarcon-Rojo i sur., 2013).

Dekontaminacija i sterilizacija. Ultrazvuk se koristi i za dekontaminaciju površina hrane i opreme, kao i za sterilizaciju tekućina. Visokofrekventni zvučni valovi mogu uništiti mikroorganizme i smanjiti broj patogena bez potrebe za visokim temperaturama ili kemijskim

sredstvima, čime se očuvaju senzorske i nutritivne karakteristike proizvoda (Bermudez-Aguirre i Barbosa-Cánovas, 2011; Villamiel i de Jong, 2000).

2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) predstavlja inovativnu metodu koja koristi visokofrekventne zvučne valove za oslobađanje bioaktivnih spojeva iz biljnih matrica. Ova tehnika koristi princip kavitacije, gdje se mjehurići u tekućini formiraju, rastu i implodiraju, stvarajući mikro-turbulencije i lokalno visok pritisak. Ovi učinci razbijaju stanične stijenke, omogućujući otapalu da proдре dublje u biljni materijal i izvuče bioaktivne spojeve (Chemat i sur., 2017).

Veća učinkovitost ekstrakcije, može i povećati prinos ekstrahiranih spojeva. Zvučni valovi visoke frekvencije stvaraju mikroskopske mjehuriće koji implodiraju, stvarajući snažne sile smicanja koje mogu razbiti stanične zidove i olakšati otpuštanje bioaktivnih spojeva. Istraživanje je pokazalo da ultrazvučna ekstrakcija može značajno povećati prinos flavonoida iz biljaka, skraćujući vrijeme i snižavajući temperaturu koja je potrebna za proces ekstrakcije (Chemat i sur., 2011). Ultrazvuk ubrzava procese ekstrakcije skraćujući vrijeme potrebno za postizanje visokih prinosa ekstrakta. U usporedbi s konvencionalnim metodama, ultrazvučna ekstrakcija može skratiti vrijeme obrade s nekoliko sati na nekoliko minuta (Chemat i sur., 2011; Mason i Lorimer, 2002). Smanjena je upotreba otapala za postizanje sličnih ili čak viših prinosa ekstrakta, što doprinosi ekološkoj prihvatljivosti i ekonomičnosti procesa (McClements, 2005; Chemat i sur., 2011.). Korištenje manjih količina otapala i nižih temperatura ekstrakcije doprinosi održivosti procesa (Chemat i sur., 2011). Zbog nižih temperatura i kraćeg vremena obrade, ultrazvučna ekstrakcija može očuvati osjetljive bioaktivne spojeve koji bi se inače mogli razgraditi u konvencionalnim procesima (Mason i Lorimer, 2002; Alarcon-Rojo i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

U ovom diplomskom radu zadatak je bio provesti ekstrakciju bioaktivnih tvari iz lista koprive (*Urtica dioica*) primjenom kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te odrediti optimalne uvjete ekstrakcije s ciljem postizanja maksimalne ekstraktibilnosti ciljanih sastojaka iz lista koprive.

Pokusi ekstrakcije su provedeni prema Box- Behnkenovom planu eksperimenta u ultrazvučnoj kupelji pri različitim uvjetima ekstrakcije, koji su uključivali različitu temperaturu ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i udio 96 %-tnog etanola u ekstrakcijskom otapalu.

Nakon ekstrakcije u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni udjeli, odnosno koncentracije ukupnih fenolnih tvari, ukupnih flavonoida, ukupnih karotenoida, klorofila a i klorofila b te antioksidacijska svojstva ekstrakata primjenom DPPH, ABTS i FRAP metoda. Također, refraktometrijski je određen indeks loma svjetlosti u dobivenim ekstraktima. Primjenom metode odzivnih površina dobivene su informacije o utjecaju pojedinog ispitivanog procesnog parametra na ekstraktibilnost bioaktivnih tvari i antioksidacijska svojstva ekstrakta, a numeričkim optimiranjem određeni su optimalni parametri ekstrakcije unutar eksperimentalnog područja. Svojstva dobivenih ekstrakata uspoređeni su sa svojstvima infuzije lista koprive dobivene klasičnom metodom pripreme čaja.

Za svaki pokus provedena su po dva paralelna eksperimentalna određivanja, a konačni rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti dobivenih rezultata.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Kopriva

Prilikom izrade ovog rada korišten je osušen i usitnjen list koprive proizvođača Travar MB d.o.o. (Milinovac 17, Hrvatska) prikazan na **Slici 2**.



Slika 2. Uzorak lista koprive korišten u istraživanju (Izvor: autor)

3.2.2. Uređaji

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (Adam Equipment, Nimbus NBL-214i, Kingston, Engleska),
- vorteks (DLab MX-S, Los Angeles, SAD),
- analizator vlage (Mettler Toledo, HR-73, Zürich, Švicarska),
- centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka),
- pH metar (pH/ORP HI 2211, HANNA Instruments d.o.o., Zagreb, Hrvatska),
- tehnička vaga (OHAUS PA4102C, OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Švicarska),
- ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200, Haan, Njemačka),
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka),
- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan),
- automatski digitalni refraktometar (RX-7000, Atago, USA).

3.2.3. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: apsolutni etanol, natrijev nitrit, natrijev acetat, natrijev hidroksid (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 2,2-iphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), željezov(II)sulfat heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), aluminijev(III)klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co KG,

Kandel, Njemačka), Folin-Ciocalteu reagens (CPAchem, Bogomilovo, Bugarska) i ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska).

3.3. METODE RADA

3.3.1. Optimiranje procesnih uvjeta ekstrakcije

Određivanje procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri kojima je moguća učinkovita ekstrakcija bioaktivnih tvari iz lista koprive, provedena je primjenom metode odzivnih površina (RSM – *Response Surface Method*) uz Box-Behnkenov dizajn pokusa. Prema dizajnu pokusa provedene su ekstrakcije pri različitim uvjetima kombinirajući tri procesna parametra (tri nezavisne varijable) uz tri nivoa (vrijednosti varijable) s jednakim intervalom između nivoa pojedine varijable. Temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i sastav ekstrakcijskog otapala (udio etanola u vodenoj otopini) odabrani su kao procesni parametri za koje je procijenjeno da mogu imati utjecaj na ekstraktibilnost bioaktivnih tvari iz lista koprive. (**Tablica 1.**)

Tablica 1. Kodirani i nekodirani nivoi nezavisnih varijabli (faktora) procesa ultrazvukom potpomognute ekstrakcije bioaktivnih tvari iz lista koprive

Tablica 1. NEZAVISNE VARIJABLE (<i>FACTORS</i>)			NIVOI VARIJABLI		
Procesni parametar	Oznaka	Jedinica	-1	0	+1
A: Temperatura ekstrakcije	T	°C	40	60	80
B: Vrijeme ekstrakcije	t	min	5	20	35
C: Udio 96 % etanola u vodenom otapalu	φ	%	0	50	100

Kombinacija uvjeta ekstrakcije (**Tablica 1.**) prema Box-Behnkenovom dizajnu pokusa uz tri ponavljanja pokusa u središnjoj točki kubičnog eksperimentalnog prostora rezultiralo je planom pokusa s ukupno 15 eksperimenata, kako je prikazano u **Tablici 2.**

Tablica 2. Plan pokusa prema Box-Behnken dizajnu eksperimenta

R.br.	A: T (°C)	B: t (min)	C: φ (%)
1	60	20	50
2	60	5	100
3	40	35	50
4	40	20	100
5	60	35	100
6	60	20	50
7	80	5	50

R.br.	A: T (°C)	B: t (min)	C: φ (%)
8	60	5	0
9	80	20	0
10	80	20	100
11	60	35	0
12	40	20	0
13	40	5	50
14	80	35	50
15	60	20	50

Nakon svakog pokusa ekstrakcije provedene su analize dobivenih ekstrakata, kako bi se odredile: koncentracija fenolnih tvari, koncentracija pigmentata i koncentracija otopljenih tvari u ekstraktu te antioksidacijska aktivnost ekstrakata (zavisne varijable, odzivi), kako je prikazano u **Tablici 3**.

Tablica 3. Svojstva ekstrakata (odzivi) prema kojima je provedena optimizacija procesa ekstrakcije bioaktivnih tvari iz lista koprive

ODZIVI (<i>RESPONSES</i>)		
Svojstvo ekstrakta	Oznaka	Jedinica
Koncentracija ukupnih fenolnih tvari	TPC	mg _{GAE} /g _{s.t.}
Koncentracija ukupnih flavonoida	TF	mg/g _{s.t.}
Koncentracija klorofila a	Ch-a	mg/g _{s.t.}
Koncentracija kolorifila b	Ch-b	mg/g _{s.t.}
Koncentracija ukupnih karotenoida	TC	mg/g _{s.t.}
Antioksidacijska aktivnost prema DPPH-testu	DPPH	mg _{TE} /g _{s.t.}
Antioksidacijska aktivnost prema FRAP-testu	FRAP	mg _{TE} /g _{s.t.}
Antioksidacijska aktivnost prema ABTS-testu	ABTS	mg _{TE} /g _{s.t.}
Koncentracija otopljenih tvari	Brix	°Bx

Na ovaj način dobiveni su eksperimentalni podaci koji su omogućili određivanje funkcionalne ovisnosti zavisnih varijabli o nezavisnim varijablama u obliku polinomnog modela drugog reda, koji je prikazan jednadžbom **(1)**:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gdje je: Y – funkcija odziva predviđena modelom, β_0 – konstanta jednadžbe polinoma odziva, β_j – koeficijent linearnog člana jednadžbe polinoma odziva, β_{jj} – koeficijent kvadratnog člana

jednadžbe polinoma odziva, β_{ij} – koeficijent međudjelovanja jednadžbe polinoma odziva, X_i i X_j – ispitivane nezavisne varijable (uvjeti procesa), k – broj varijabli.

Temeljem dobivenih matematičkih modela izrađene su 3D odzivne površine, odnosno grafički prikazi utjecaja procesnih parametara na promatrane zavisne varijable.

Program Design-Expert v.13 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) korišten je za izradu dizajna eksperimenta, modeliranje procesa pomoću nelinearne regresijske analize, statističku analizu (ANOVA) te optimiranje procesa ultrazvukom potpomognute kruto-tekuće ekstrakcije antioksidacijskih tvari iz lista koprive.

3.3.1. Priprema uzorka

Za pripremu uzoraka za ekstrakciju, uzorak lista koprive se dodatno usitnio na laboratorijskom mlinu (Retsch ZM200, Haan, Njemačka).

3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Svi pokusi ekstrakcije provedeni su u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka) pri frekvenciji od 37 kHz i 60 % snage ultrazvuka u *sweep* modu. Za svaki pokus ekstrakcije u laboratorijsku tikvicu s poklopcem odvagan je približno 1 g usitnjenog uzorka lista koprive te je u svaku tikvicu dodano po 50 mL ekstrakcijskog otapala. Sadržaj svake tikvice je prije postavljanja u kupelj dobro promiješan kako bi se homogenizirala ekstrakcijska smjesa. Procesni uvjeti (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i sastav ekstrakcijskog otapala) za svaki pokus ekstrakcije postavljen je sukladno prethodni prikazanog **Tablici 2**.

Nakon provedene ekstrakcije provedeno je razdvajanje ekstrakta od zaostalog krutog ostatka listova koprive pomoću filtracije.

Osim ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, kao kontrolni pokusi ekstrakcije fenolnih tvari i pigmentata, priređene su dvije infuzije lista koprive metodom maceracije koja predstavlja klasičnu metodu pripreme čaja lista koprive. Naime, prvi kontrolni pokus priređen je na način da je u laboratorijsku čašu odvagan 1 g usitnjenog lista koprive čaši preliven sa 150 mL vode temperature 80 °C, dok je u drugom kontrolnom pokusu 1 g usitnjenog lista koprive preliven s 50 mL vode temperature 80 °C. U oba pokusa, sadržaji čaša su zatim promiješani, čaše su poklopljene satnim staklom, te su ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon toga, sadržaj čaša je profiltriran kroz filter papir pri čemu su filtrati predstavljali kontrolne

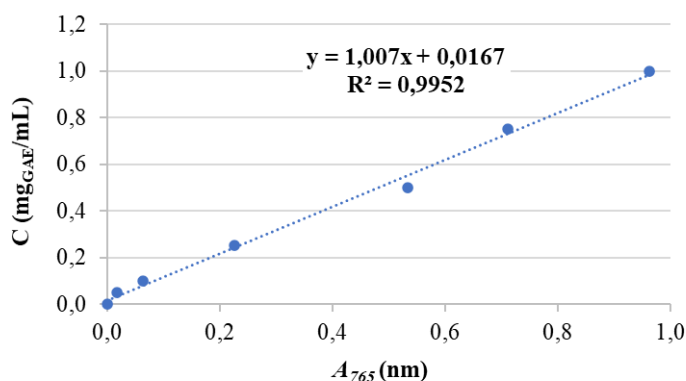
ekstrakte (infuzije) kojima su određena svojstva kao i u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom.

3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prilikom određivanja ukupnih fenolnih tvari (TPC) u ekstraktu korištena je Folin-Ciocalteu metoda uz galnu kiselinu kao standard. Za izradu baždarne krivulje galne kiseline priređena je temeljna standarda otopina (stock otopina) galne kiseline tako da je u odmjernoj tikvici od 100 mL otopljeno 0,5 g galne kiseline u 10 mL etanola te je nadopunjeno destiliranom vodom do oznake od 100 mL. Iz stock otopine priređena su odgovarajuća razrjeđenja kako bi se dobile otopine različitih koncentracija galne kiseline u rasponu 0 – 1 mg/mL.

Sam postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari u uzorcima (otopinama standarda i ekstraktima) provodio se tako da se u epruvetu otpipetirao volumen od 40 μL uzorka, 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin-Ciocalteuova reagensa te se uzorak promiješa homogenizira na vorteksu. Nakon 8 minuta dodaje se 600 μL 20%-tne pripremljene vodene otopine Na_2CO_3 i opet homogenizira. Tako pripremljen uzorak ostavlja se u vodenoj kupelji na 40 $^\circ\text{C}$ kroz 30 minuta, nakon čega se na spektrofotometru očitava apsorbancija pri 765 nm. Za slijepu probu korišten je etanol. Sve analize su rađene u dvije paralele svaka po tri ponavljanja, a rezultati su izrađeni kao srednje vrijednosti.

Koncentracija ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima određena iz baždarne krivulje (**Slika 3.**) s obzirom na određene apsorbancije, a konačni rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline po masi suhe tvari uzorka lista koprive ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$).

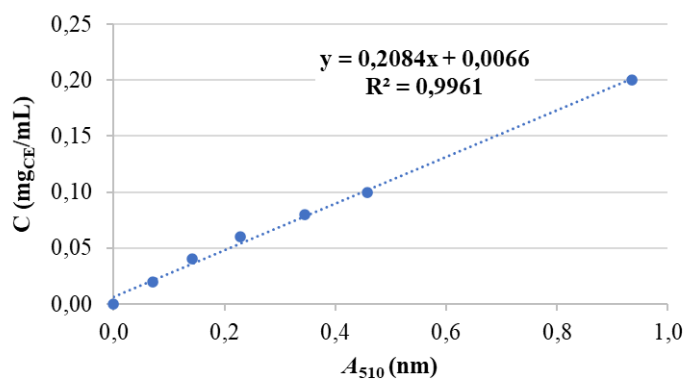


Slika 3. Baždarna krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari (standard: galna kiselina)

3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi (TF) su određivani sprektrofotometrijskom metodom uz korištenje aluminijevog klorida (Marinova i sur., 2005). Za izradu baždarne krivulje koristile su otopine katehina poznatih koncentracija (Slika 4.).

Postupak je proveden na način da se u epruvetu doda 2 mL destilirane vode, 0,5 mL ekstrakta, 0,15 mL natrijevog nitrita te se čeka 5 minuta. Potom se doda 0,15 mL 10%-tne vodene otopine aluminijevog klorida te se čeka još 6 minuta, nakon čega se doda 1 mL 1 M natrijevog hidroksida i nadopuni destiliranom vodom do 5 mL (dodaje se 1,2 mL). Prilikom izrade slijepa probe isti je postupak, uz izuzetak da umjesto ekstrakta se koristi destilirana voda. Prije mjerenja apsorbancije pri 510 nm, uzorak se homogenizira na vorteks uređaju. Analiza je rađena u dvije paralele svaka po tri ponavljanja.



Slika 4. Baždarna krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari (standard: katehin)

Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktima određena je iz baždarne krivulje (Slika 4.) s obzirom na određene apsorbancije, a konačni rezultat je izražen kao ekvivalent katehina po masi suhe tvari uzorka lista koprive (mg_{CE}/g_{s.t.}).

3.3.5. Određivanje klorofila a i b te ukupnih karotenoida

Metoda se temelji na spektrofotometrijskom određivanju klorofila a i b te ukupnih karotenoida, s tim da svaki pigment ima svoj apsorpcijski spektar i maksimum koji postiže, a karakterističan je samo za njega. Kao otapalo se koristi etanol i pritom klorofil a (Ch-a) postiže maksimum apsorpcije u plavom dijelu spektra na 430 nm i crvenom na 660 nm, dok se maksimum za klorofil b (Ch-b) nalazi na 450 nm i 640 nm (Abou-Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2015).

Postupak. Najprije se dobiveni ekstrakti razrijede sa 96 %-tnim etanolom i mjeri se apsorbancija uzoraka na 470 nm, 649 nm i 664 nm. Prije uzoraka, potrebno je načiniti slijepu

probu na isti način gdje se umjesto uzorka uzima samo etanol. Svako mjerenje se provodi u paraleli. Nakon očitavanja apsorbanci udjeli klorofila i karotenoida se računaju prema jednadžbama (2) – (4), kako je prikazano u nastavku (Sumanta i sur., 2014):

$$\text{Ch-a} = 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649} \quad (2)$$

$$\text{Ch-b} = 27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664} \quad (3)$$

$$\text{TC} = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot \text{Ch-a} - 97,63 \cdot \text{Ch-b})/209 \quad (4)$$

gdje je: Ch-a – klorofil a ($\mu\text{g/mL}$); Ch-b – klorofil b ($\mu\text{g/mL}$); TC – ukupni karotenoidi, koji predstavljaju sumu ksantofila i karotenoida ($\mu\text{g/mL}$); A_{664} – apsorbancija pri 664 nm (-); A_{649} – apsorbancija pri 649 nm; A_{470} – apsorbancija pri 470 nm.

Prije određivanja apsorbancije pri odgovarajućoj valnoj duljini pojedini ekstrakti su razrijeđeni od 2 do 15 puta, kako bi se na odgovarajući način mogle primijeniti jednadžbe (2) – (4), i to:

- 2 puta su razrijeđeni ekstrakti iz pokusa br.: 7, 11 i 12,
- 5 puta su razrijeđeni ekstrakti iz pokusa br.: 1, 6, 8, 9, 13, 14 i 15,
- 10 puta su razrijeđeni ekstrakti iz pokusa br.: 3,
- 15 puta su razrijeđeni ekstrakti iz pokusa br.: 2, 4, 5 i 10.

Dobiveni rezultati su preračunati na masu suhe tvari lista koprive ($\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$) te su konačni rezultati izraženi kao srednje vrijednosti dva paralelna određivanja.

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta

DPPH metoda

Princip DPPH metode određivanja antioksidacijske aktivnosti (AA) temelji se na redukciji sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala DPPH \bullet , koji u alkoholnoj otopini u blizini antioksidansa AH reagira pri čemu nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal A (Benvenuti i sur., 2004.). Na ovaj način dolazi do smanjenja koncentracije slobodnog DPPH radikala (DPPH \bullet) te promjene boje reakcijske smjese (iz ljubičaste u žutu), što se može mjeriti spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri $\lambda = 515$ nm. Inhibirani radikal DPPH je dokaz antioksidacijske aktivnosti u uzorku.

Postupak ide tako da se u epruvetu doda 0,1 mL ekstrakta, 3,9 mL otopine DPPH \bullet u 96%-tnom etanolu (0,026 $\text{mg}_{\text{DPPH}}/\text{mL}$). Tako napravljena otopina se stavlja na tamno mjesto i ostavlja 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 515 nm u

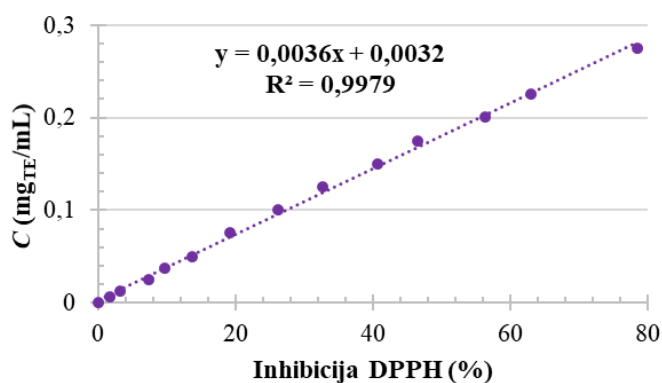
odnosu na slijepu probu (postupak je isti, s izuzetkom korištenja etanola u mjesto ekstrakta). Antioksidacijska aktivnost određuje se u dvije paralele svake po tri ponavljanja, rezultat se potom izražava kao srednja vrijednost određivanja.

Prilikom izračunavanja % inhibicije DPPH• koristi se jednadžba (5) (Benvenuti i sur., 2004):

$$\text{Inhibicija DPPH (\%)} = \left(\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{uz}}}{A_{\text{DPPH}}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je: A_{DPPH} – apsorbancija otopine DPPH• pri 649 nm (–); A_{uz} – apsorbancija testiranog uzorka pri 649 nm.

Izračunate vrijednosti inhibicije DPPH• su pomoću baždarnе krivulje (Slika 5) izražene kao odgovarajuće koncentracije standarda troloksa ($\text{mg}_{\text{TE}}/\text{mL}$), te su konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata izražene kao ekvivalenti troloksa po masi suhe tvari uzorka iz kojeg je dobiven ekstrakt (AA_{DPPH} , $\text{mg}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Sva mjerenja su provedena u tri paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost istih.



Slika 5. Baždarna krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi uz troloks kao standard

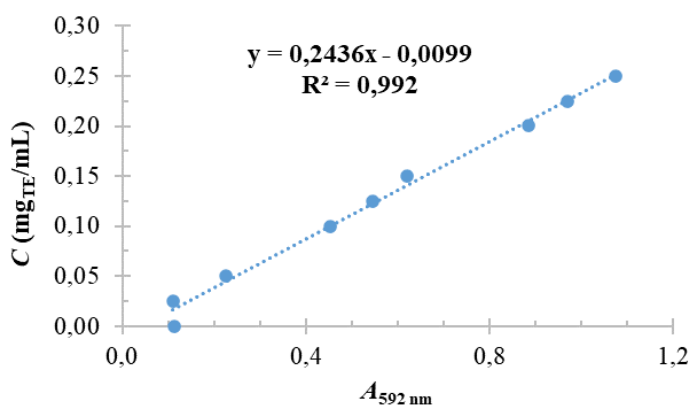
FRAP metoda

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta prema FRAP metodi (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) proizlazi iz redukcije iona željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} u prisustvu antioksidansa. Takav Fe^{2+} ion će u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazin reagensa (TPZT) tvoriti plavi kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 592 nm (Jolić, 2017).

Reagensi potrebni za provedbu analize: acetatni pufer pH 3,6; 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ); 40 mM otopina klorovodične kiseline te 20 mM otopina $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pripremljeni su prema Šelo (2022).

Uzorci ekstrakata za analizu su pripremljeni na način da je pomiješano 2,7 mL FRAP reagensa, 270 μ L destilirane vode i 150 μ L uzorka nakon čega je smjesa inkubiran u tami, pri 37 °C tijekom 40 minuta, nakon čega je spektrofotometrijski očitana apsorbancija pri 592 nm.

Pomoću baždarne krivulje (Slika 6) i određenih vrijednosti apsorbancija očitane su odgovarajuće koncentracije standarda troloksa ($\text{mg}_{\text{TE}}/\text{mL}$), te su konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata izražene kao ekvivalenti troloksa po masi suhe tvari uzorka iz kojeg je dobiven ekstrakt (AA_{FRAP} , $\text{mg}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Sva mjerenja su provedena u tri paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost istih.



Slika 6. Baždarna krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi uz troloks kao standard

ABTS metoda

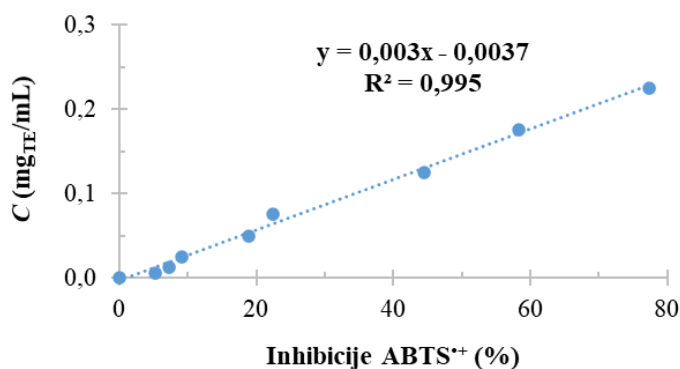
Princip ABTS metode se temelji na redukciji ABTS^{•+} radikalskog kationa u prisustvu antioksidansa, što rezultira smanjenjem intenziteta plavo-zelenog obojenja reakcijske smjese što je mjerljivo spektrofotometrijski pri valno duljini od 734 nm. Na obezbojenje otopine utječe antioksidacijska aktivnost uzorka, koncentracija antioksidansa i vrijeme trajanja reakcije (Re i sur., 1999). Svi reagensi potrebni za provedbu analize pripremljeni su prema Šelo (2022).

Postupak. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti uzorka, pomiješano je 950 μ L otopine ABTS^{•+} radikala i 50 μ L ekstrakata je nakon 10 minuta inkubacije reakcijske smjese na tamnom mjestu, pomoću spektrofotometra je očitana aporbancija pri 734 nm. Kontrolni uzorak pripremljen je na isti način, ali je umjesto ekstrakta korišten etanol, dok je slijepu probu činio apsolutni etanol. Inhibicija ABTS^{•+} radikala (%) izračunata je prema izrazu (6):

$$\text{Inhibicija ABTS (\%)} = \left(\frac{A_k - A_{uz}}{A_k} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je: A_k – apsorbancija kontrolnog uzorka (–); A_{uz} – apsorbancija testiranog uzorka (–).

Kao i u prethodnim testovima za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka, troloks se koristio kao standard za koji je izrađena baždarna krivulja prikazana na **Slici 7**, a konačni rezultati prikazani su kao ekvivalent troloksa po suhoj tvari uzorka iz kojega je dobiven ekstrakt. Sva mjerenja su provedena u tri paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost istih.



Slika 7. Baždarna krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti prema ABTS metodi uz troloks kao standard

3.3.7. Refraktometrijsko određivanje koncentracije otopljenih tvari u ekstraktu

Refraktometrijsko određivanje otopljenih krutih tvari u ekstraktu, odnosno ekstrahiranih tvari iz lista koprive temelji se na mjerenju loma svjetlosti (indeksa refrakcija) u otopinama te se izražava u stupnjevima Brix-a (°Bx) ili postocima (%Bx), što odgovara 1 g otopljene krute tvari na 100 g otopine (ekstrakta). Refraktometrija se temelji na principu proporcionalnog porasta indeksa loma s porastom gustoće otopine.

Mjerenje indeksa refrakcije provodilo se na način da se mjerna komorica refraktometra ispunjavala s malim volumenom ekstraktom (jedna kap ekstrakta) te je nakon kratog temperiranja automatski određen indeks loma (°Bx ili %Bx) što se moglo očitati s digitalnog displeja uređaja.

Konačni rezultat za svaki uzorak izražen je kao srednja vrijednost dva uzastopna mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST BIOAKTIVNIH TVARI IZ LISTA KOPRIVE

Ukupno 15 eksperimenata ultrazvukom kruto-tekuće ekstrakcije bioaktivnih tvari iz lista koprive provedeno je sukladno planu pokusa kako je opisano u podglavljima 3.3.1. – 3.3.2. Svi dobiveni ekstrakti analizirani kako je opisano u podglavljima 3.3.3. – 3.3.7. Rezultati analize ekstrakata, prikazani su u **Tablici 4**.

Tablica 4. Eksperimentalno dobiveni rezultati prema zadanom planu pokusa

R.br.	FAKTORI			ODZIVI								
	A: <i>T</i>	B: <i>t</i>	C: φ	TPC	TF	Ch-a	Ch-b	TC	DPPH	FRAP	ABTS	Brix
	(°C)	(min)	(%)	(mg _{GAE} /g _{s.t.})	(mg/g _{s.t.})	(mg/g _{s.t.})	(mg/g _{s.t.})	(mg/g _{s.t.})	(mg _{TE} /g _{s.t.})	(mg _{TE} /g _{s.t.})	(mg _{TE} /g _{s.t.})	(°Bx)
1	60	20	50	15,98	3,09	0,88	0,47	0,04	11,58	38,02	55,84	17,32
2	60	5	100	2,22	2,97	2,27	0,89	0,04	1,67	7,46	11,11	19,80
3	40	35	50	13,60	3,38	0,95	1,41	0,43	11,10	35,91	43,19	19,50
4	40	20	100	2,83	3,42	3,52	0,77	0,94	1,98	9,39	13,55	19,90
5	60	35	100	4,58	4,46	3,92	1,05	0,95	3,11	14,08	24,11	19,89
6	60	20	50	17,15	5,48	0,85	0,44	0,15	12,97	36,47	53,32	17,32
7	80	5	50	19,15	5,76	0,61	0,21	0,17	14,48	39,96	60,11	17,44
8	60	5	0	16,52	4,59	0,50	1,22	0,13	7,31	30,94	32,93	0,51
9	80	20	0	14,12	5,49	0,72	1,83	0,11	5,69	20,55	15,60	0,62
10	80	20	100	3,87	3,66	3,59	0,99	0,91	2,32	10,98	10,18	20,06
11	60	35	0	15,92	5,09	0,27	0,62	0,09	6,27	25,42	39,33	9,13
12	40	20	0	7,16	5,15	0,20	0,45	0,04	8,53	18,31	11,32	0,81
13	40	5	50	9,78	3,33	0,88	0,40	0,26	9,49	25,62	16,86	19,20
14	80	35	50	18,16	4,96	1,09	0,53	0,21	13,92	23,34	28,80	17,32
15	60	20	50	16,51	5,27	0,82	0,38	0,23	13,44	36,34	37,94	17,27

Temeljem dobivenih podataka prikazanih u **Tablici 4**. Korištenje Design-Expert v.13 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) provedeno je matematičko modeliranje, odnosno određene su funkcionalne ovisnosti koncentracije: fenolnih tvari (TPC, TF), pigmentata (Ch-a, Ch-b, TC) i otopljenih krutih tvari (°Bx) u ekstraktu te antioksidacijske aktivnosti ekstrakata (DPPH, FRAP, ABTS) o procesnim parametrima (temperaturi ekstrakcije, vremenu ekstrakcije i koncentraciji

etanola u otapalu). Rezultati statističke obrade podataka za sve ovisnosti varijabli koje su dobivene nelinearnom regresijom, odnosno matematičke modele, prikazani su u **Tablici 5**.

Tablica 5. Rezultati analize varijance (ANOVA) za utjecaj parametara ekstrakcije na odzivna svojstva ekstrakta (TPC, TF, Ch-a, Ch-b, TC, DPPH, FRAP, ABTS, Brix)

Izvor	TPC (mg _{GAE} /g _{s.t.})					TF (mg/g _{s.t.})					
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p	
Model	502,95	9	55,88	13,62	0,0051*	7,05	3	2,35	3,82	0,0425*	
A: <i>T</i>	60,12	1	60,12	14,65	0,0123*	2,63	1	2,63	4,28	0,0628	
B: <i>t</i>	2,63	1	2,63	0,6418	0,4594	0,1922	1	0,1922	0,3127	0,5872	
C: φ	202,21	1	202,21	49,28	0,0009*	4,22	1	4,22	6,86	0,0238*	
AB	5,78	1	5,78	1,41	0,2884						
AC	8,76	1	8,76	2,14	0,2038						
BC	2,19	1	2,19	0,5338	0,4978						
A ²	16,20	1	16,20	3,95	0,1037						
B ²	1,92	1	1,92	0,4670	0,5247						
C ²	205,32	1	205,32	50,04	0,0009*						
Residual	20,52	5	4,10			6,76	11	0,6147			
<i>Lack of Fit</i>	19,83	3	6,61	19,26	0,0498*	3,26	9	0,3620	0,2067	0,9626 ^{ns}	
<i>Pure Error</i>	0,6865	2	0,3432			3,50	2	1,75			
<i>Cor Total</i>	523,47	14				13,81	14				
R²			0,9608					0,5103			

Izvor	Ch-a (mg/g _{s.t.})					Ch-b (mg/g _{s.t.})					
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p	
Model	22,25	9	2,47	52,54	0,0002*	1,53	9	0,1695	0,6347	0,7395 ^{ns}	
A: <i>T</i>	0,0265	1	0,0265	0,5620	0,4872	0,0351	1	0,0351	0,1315	0,7317	
B: <i>t</i>	0,4851	1	0,4851	10,31	0,0237*	0,0990	1	0,0990	0,3708	0,5692	
C: φ	16,85	1	16,85	357,99	< 0,0001*	0,0220	1	0,0220	0,0826	0,7854	
AB	0,0420	1	0,0420	0,8929	0,3881	0,1190	1	0,1190	0,4458	0,5339	
AC	0,0506	1	0,0506	1,08	0,3472	0,3364	1	0,3364	1,26	0,3127	
BC	0,8836	1	0,8836	18,77	0,0075*	0,1444	1	0,1444	0,5408	0,4951	
A ²	0,0831	1	0,0831	1,77	0,2414	0,0685	1	0,0685	0,2567	0,6339	
B ²	0,0510	1	0,0510	1,08	0,3457	0,0187	1	0,0187	0,0702	0,8016	
C ²	3,75	1	3,75	79,63	0,0003*	0,7271	1	0,7271	2,72	0,1598	
Residual	0,2353	5	0,0471			1,33	5	0,2670			
<i>Lack of Fit</i>	0,2335	3	0,0778	86,49	0,0115*	1,33	3	0,4436	211,23	0,0047*	
<i>Pure Error</i>	0,0018	2	0,0009			0,0042	2	0,0021			
<i>Cor Total</i>	22,49	14				2,86	14				
R²			0,9895					0,5332			

df – stupanj slobode; SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; MS – varijanca; F – Fisherov koeficijent; p – p-vrijednost; *Residual* – ostatak; *Lack of Fit* – nedostatak modela; *Pure Error* – pogreška; *Pure Total* – ukupno; R² – koeficijent multiple determinacije; * – statistički značajno (p < 0,05); ^{ns} – nije statistički značajno (p > 0,05)

Tablica 5. – nastavak tablice

Source	TC (mg/g _{s.t.})					DPPH (mg _{TE} /g _{s.t.})				
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Model	1,39	9	0,1543	3,93	0,0729 ^{ns}	281,19	9	31,24	10,17	0,0100*
A: T	0,0091	1	0,0091	0,2324	0,6501	3,52	1	3,52	1,15	0,3332
B: t	0,1458	1	0,1458	3,72	0,1117	0,2628	1	0,2628	0,0855	0,7817
C: φ	0,7626	1	0,7626	19,45	0,0070*	43,80	1	43,80	14,25	0,0130*
AB	0,0042	1	0,0042	0,1077	0,7560	1,18	1	1,18	0,3830	0,5631
AC	0,0025	1	0,0025	0,0638	0,8107	2,53	1	2,53	0,8225	0,4060
BC	0,2256	1	0,2256	5,75	0,0617	1,54	1	1,54	0,5003	0,5110
A ²	0,0975	1	0,0975	2,49	0,1757	0,1304	1	0,1304	0,0424	0,8449
B ²	0,0045	1	0,0045	0,1153	0,7479	0,1918	1	0,1918	0,0624	0,8127
C ²	0,1440	1	0,1440	3,67	0,1134	227,26	1	227,26	73,94	0,0004*
Residual	0,1961	5	0,0392			15,37	5	3,07		
Lack of Fit	0,1779	3	0,0593	6,52	0,1359 ^{ns}	13,50	3	4,50	4,81	0,1769 ^{ns}
Pure Error	0,0182	2	0,0091			1,87	2	0,9354		
Cor Total	1,58	14				296,55	14			
R ²			0,8762					0,9482		

Source	FRAP (mg _{TE} /g _{s.t.})					ABTS (mg _{TE} /g _{s.t.})				
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Model	1699,96	9	188,88	22,22	0,0016*	3732,04	9	414,67	4,12	0,0667 ^{ns}
A: T	3,92	1	3,92	0,4610	0,5273	110,78	1	110,78	1,10	0,3420
B: t	3,42	1	3,42	0,4021	0,5539	25,99	1	25,99	0,2584	0,6328
C: φ	355,24	1	355,24	41,78	0,0013*	202,31	1	202,31	2,01	0,2153
AB	181,04	1	181,04	21,29	0,0058*	830,59	1	830,59	8,26	0,0348*
AC	0,1056	1	0,1056	0,0124	0,9156	14,63	1	14,63	0,1454	0,7186
BC	36,84	1	36,84	4,33	0,0919	10,89	1	10,89	0,1083	0,7555
A ²	99,90	1	99,90	11,75	0,0187*	624,04	1	624,04	6,20	0,0551
B ²	1,05	1	1,05	0,1239	0,7392	5,38	1	5,38	0,0535	0,8263
C ²	1058,83	1	1058,83	124,53	0,0001*	2016,65	1	2016,65	20,05	0,0065*
Residual	42,51	5	8,50			502,94	5	100,59		
Lack of Fit	40,76	3	13,59	15,55	0,0610 ^{ns}	315,18	3	105,06	1,12	0,5039 ^{ns}
Pure Error	1,75	2	0,8736			187,77	2	93,88		
Cor Total	1742,47	14				4234,98	14			
R ²			0,9756					0,8812		

df – stupanj slobode; SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; MS – varijanca; F – Fisherov koeficijent; p – p-vrijednost; *Residual* – ostatak; *Lack of Fit* – nedostatak modela; *Pure Error* – pogreška; *Pure Total* – ukupno; R² – koeficijent multiple determinacije; * – statistički značajno (p < 0,05); ^{ns} – nije statistički značajno (p > 0,05)

Tablica 5. – nastavak tablice

Source	Brix (°Bx)				
	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Model	788,98	9	87,66	21,92	0,0017*
A: <i>T</i>	1,97	1	1,97	0,4926	0,5141
B: <i>t</i>	9,88	1	9,88	2,47	0,1768
C: φ	587,90	1	587,90	147,00	< 0,0001*
AB	0,0441	1	0,0441	0,0110	0,9205
AC	0,0306	1	0,0306	0,0077	0,9337
BC	18,19	1	18,19	4,55	0,0861
A ²	0,7870	1	0,7870	0,1968	0,6759
B ²	8,57	1	8,57	2,14	0,2032
C ²	155,72	1	155,72	38,94	0,0015*
<i>Residual</i>	20,00	5	4,00		
<i>Lack of Fit</i>	19,99	3	6,66	7997,97	0,0001*
<i>Pure Error</i>	0,0017	2	0,0008		
<i>Cor Total</i>	808,97	14			
<i>R</i> ²			0,9753		

df – stupanj slobode; SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; MS – varijanca; F – Fisherov koeficijent; *p* – *p*-vrijednost; *Residual* – ostatak; *Lack of Fit* – nedostatak modela; *Pure Error* – pogreška; *Pure Total* – ukupno; *R*² – koeficijent multiple determinacije; * – statistički značajno ($p < 0,05$); ^{ns} – nije statistički značajno ($p > 0,05$)

Prema rezultatima nelinearne regresije i statističke analize (**Tablica 5.**), ovisnost nezavisnih varijabli: TPC, Ch-a, DPPH, FRAP i Brix o procesnim parametrima uspješno se mogu opisati kvadratnim modelima ($p < 0,05$ za Model) uz visoke vrijednosti koeficijenta multiple determinacije (R^2 u rasponu 0,9482 – 0,9895). Za opisivanje funkcionalna ovisnost TF o procesnim parametrima može se opisati linearnim matematičkim modelom ($p < 0,05$ za Model) uz $R^2 = 0,5103$. Za odzivne vrijednosti nezavisnih varijabli: Ch-a, TC i ABTS nelinearna regresija kvadratnim matematičkim modelom nije je pokazala statistički značajnom što ($p > 0,05$ za Model) da se predloženi model ne može koristiti za opisivanje funkcionalne ovisnosti nezavisnih varijabli o procesni parametrima. Primjena matematičkog modela višeg reda (kubičnog modela) pokazala je statistički značajno slaganje eksperimentalnih i prema modelu izračunatih vrijednosti nezavisnih varijabli međutim modeli višeg reda se ne preporučuju za optimiranje zbog toga što često rezultiraju „stepenastim“ odzivom.

Koeficijenti regresijskih jednadžbi, odnosno matematičkih modela koji opisuju funkcionalnu ovisnost pojedinog odziva o ispitivanim faktorima (nezavisnim varijablama) za sve odzive prikazani su u **Tablici 6.** Također, u tablici je označena statistička značajnost utjecaja pojedinog procesnog parametra na pojedine odzivne varijable.

Tablica 6. Regresijski koeficijenti matematičkih modela i statistička značajnost utjecaja pojedinog faktora na odzivna svojstva ekstrakta (TPC, TF, Ch-a, Ch-b, TC, DPPH, FRAP, ABTS, Brix)

	Odsječak	A: <i>T</i>	B: <i>t</i>	C: φ	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
TPC	16,55	2,74**	0,5737	-5,03**	-1,20	-1,48	0,74	-2,09	0,7204	-7,46**
TF	4,41	0,5737*	0,155	-0,726**						
Ch-a	0,850	0,0575	0,2463**	1,45**	0,1025	-0,1125	0,47**	0,15	-0,1175	1,01**
Ch-b	0,43	0,0662	0,1112	-0,0525	-0,1725	-0,29	0,19	0,1362	0,0712	0,4437
TC	0,14	-0,03375	0,135	0,309**	-0,0325	-0,025	0,2375*	0,1625	-0,035	0,1975
DPPH	12,6633	0,66375	0,1812	-2,34**	-0,5425	0,795	0,62	-0,1879	-0,2279	-7,85**
FRAP	36,9433	0,7	-0,6538	-6,66**	-6,73**	-0,1625	3,03*	-5,20**	-0,5342	-16,93**
ABTS	49,0333	3,7213	1,80	-5,03	-14,41**	-1,9125	1,65	-13,00*	1,21	-23,37**
Brix	17,3033	-0,49625	1,11	8,57**	-0,105	0,0875	-2,13*	-0,4617	1,52	-6,49**

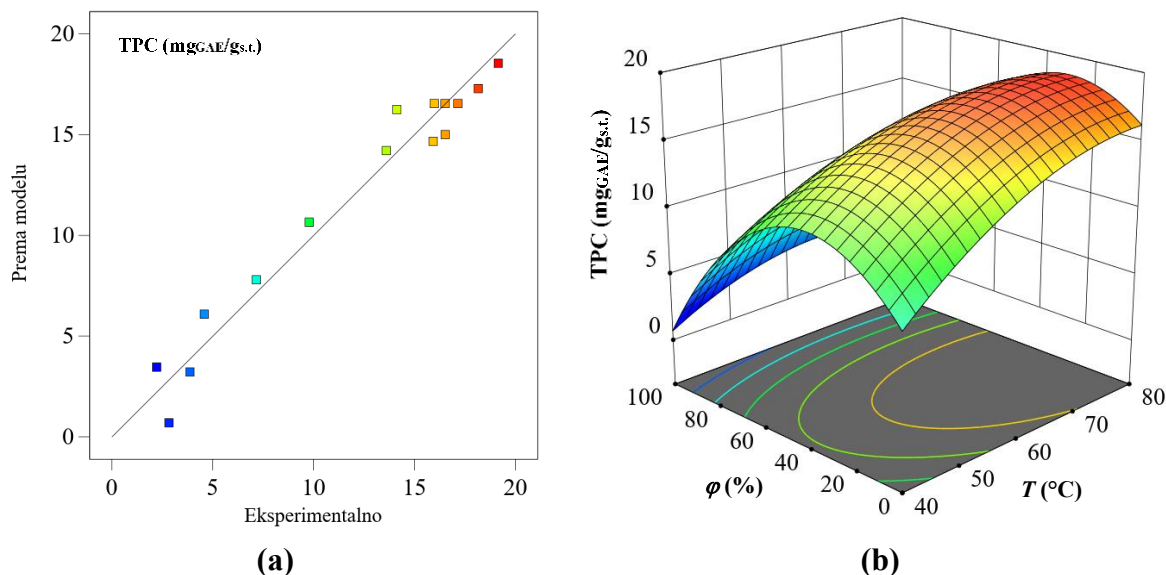
** statistički značajno uz $p < 0,5$ * statistički značajno uz $0,5 \leq p \leq 0,1$

Prema rezultatima navedenim u **Tablicama 5. i 6.** može se procijeniti statistička značajnost utjecaja pojedinog procesnog parametra na odzivno svojstvo ekstrakta te „snagu“ i „smjer“ tog utjecaja. Ukoliko je regresijski koeficijent statistički značajan ($p < 0,05$ ili $0,5 < p < 0,05$) on ima utjecaj na odzivno svojstvo. Ukoliko regresijski koeficijent nema statističku značajnost ($p > 0,05$) on ne utječe na odzivno svojstvo te ne doprinosi matematičkom modelu. Predznak regresijskog koeficijenta definira „smjer“ ovisnosti odziva o nezavisnoj varijabli. Točnije, ukoliko je uz koeficijent predznak „+“, utjecaj nezavisne varijable na odziv je proporcionalan, tj. s povećavanjem vrijednosti procesnog parametra povećavat će se i vrijednost odzivnog svojstva, i obrnuto. Ukoliko je uz regresijski koeficijent predznak „-“, utjecaj nezavisne varijable na odziv će biti obrnuto proporcionalan, tj. s povećanjem s povećavanjem vrijednosti procesnog parametra smanjivat će se vrijednost odzivnog svojstva. Veća vrijednost regresijskog koeficijent sugerira veći utjecaj na odzivno svojstvo. Općenito, prema statističkim pokazateljima može se zaključiti da je otapalo, odnosno koncentracija etanola u vodenom otapalu procesni parametra koji je imao najveći utjecaj na svojstva (sastav) ekstrakta.

Regresijski koeficijenti navedenim u **Tablici 6.** daju matematičke modele koji opisuju 3D odzivne površine prikazane na **Slikama 8. – 14.** Za odzive za koje nije utvrđena statistički značajan linearni utjecaj niti jednog faktora (procesnog parametra) nije primjenjivo korištenje predloženog matematičkog modela za opisivanje funkcionalne ovisnosti odziva o faktorima u ispitivanom eksperimentalnom području, a u ovom slučaju to se odnosi na odzive: Ch-b i ABTS.

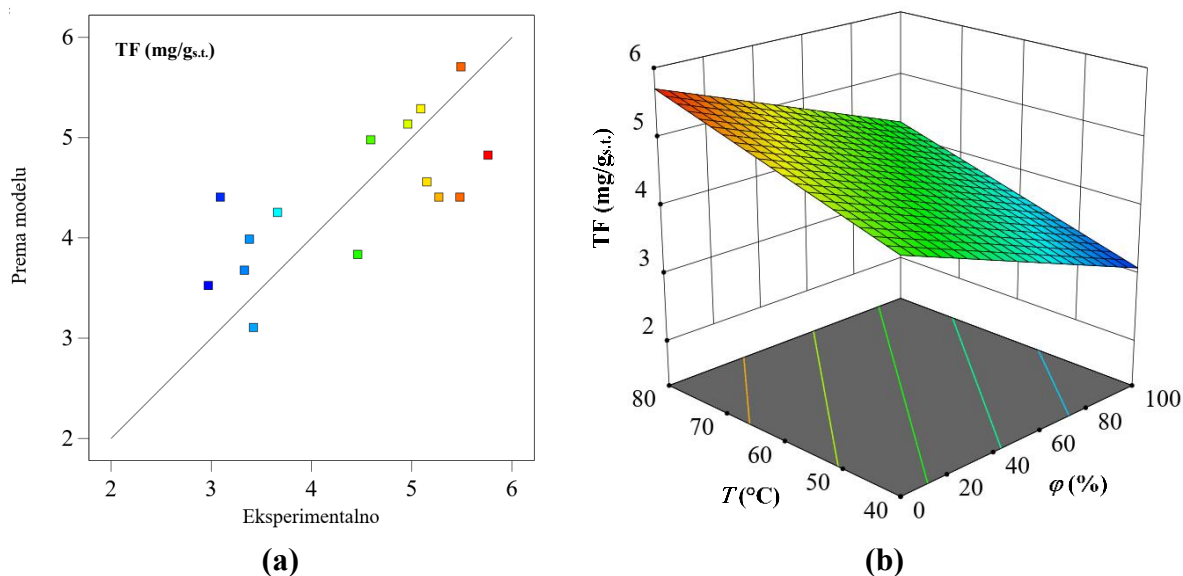
Slika 8.a prikazuje odnos eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu pri čemu je vidljiva dobra korelacija između

navedenih vrijednosti ($R^2 = 0,9608$, **Tablica 5.**). Navedeno potvrđuje primjenjivost matematičkog modela za opisivanje ovisnosti ovog odziva o faktorima, odnosno primjenu matematičkog modela za predviđanje koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu pri različitim eksperimentalnim uvjetima unutar ispitivanog raspona procesnih parametara.



Slika 8. Koncentracija ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu (TPC): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija temperature ekstrakcije (T) i udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta

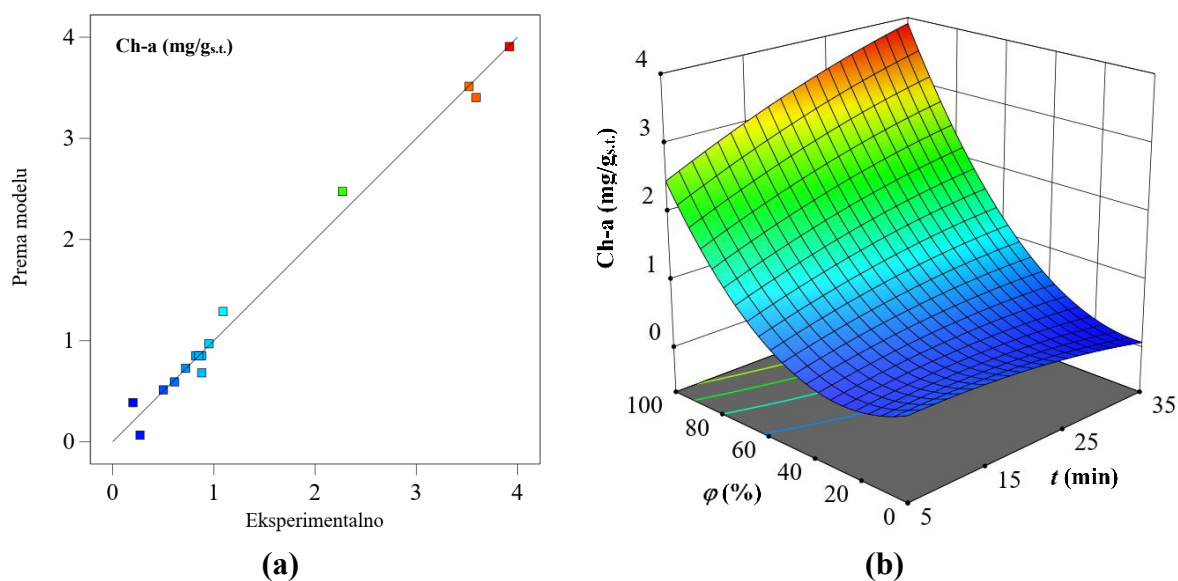
Prema **Tablici 6.** i **Slici 8.b** vidljivo je da je koncentracija ukupnih fenolnih tvari (TPC) u ekstraktu bila ovisna o temperaturi ekstrakcije (linearna ovisnost) i koncentraciji otapala (linearna i kvadratna ovisnost) pri čemu se s povećanjem temperature ekstrakcije povećava koncentracija ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu. Statistička značajnost kvadratnog utjecaja otapala (C^2 , **Tablica 6.**) sugerira da s početnim povećanjem udjela etanola u otapalu dolazi do povećanja ekstraktibilnosti ukupnih fenolnih tvari iz lista koprive, dok daljnjim povećanjem udjela etanola u otapalu dolazi do smanjivanja koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu. Nešto slabije slaganje izračunatih vrijednosti i eksperimentalno određenih vrijednosti koncentracije ukupnih flavonoida (TF) u ekstraktu ($R^2 = 0,5103$, **Tablica 5.**) prikazani su na **Slici 9.a.**



Slika 9. Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu (TF): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i temperature ekstrakcije (T), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta

Udio etanola u otapalu i temperatura ekstrakcije imali su linearan utjecaj na koncentraciju ukupnih flavonoida u ekstraktu pri čemu se s povećanje udjela etanola u otapalu smanjivala koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu (**Slika 9.b**). S druge strane, s povećanjem temperature ekstrakcije povećavao se sadržaj ekstrahiranih ukupnih flavonoida u ekstraktu.

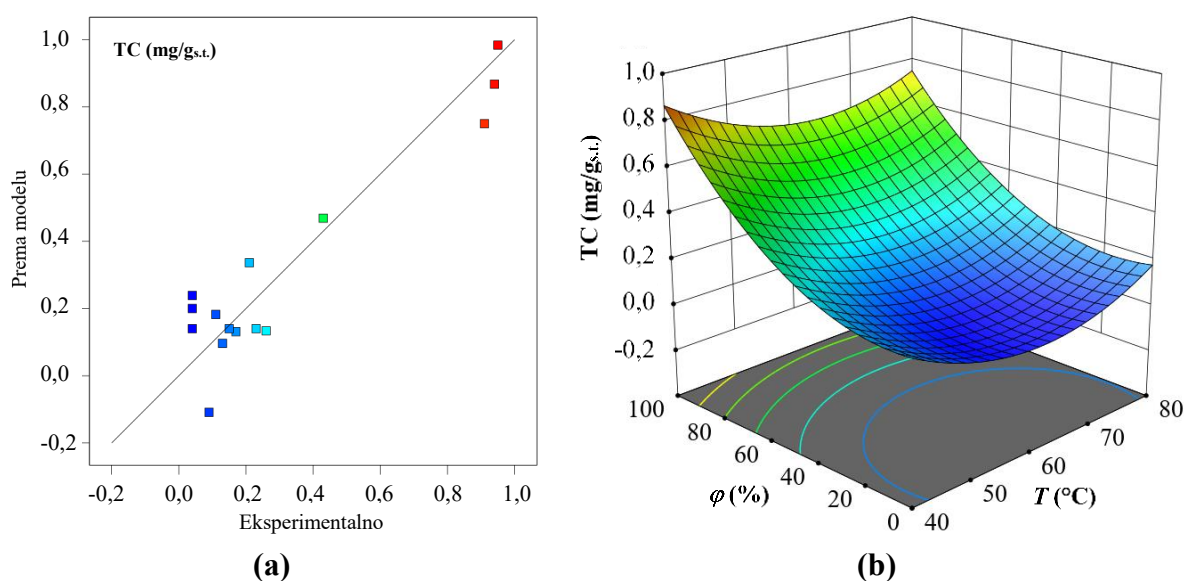
Predloženi kvadratni matematički model za klorofil a (**Tablica 6.**) dao je dobra slaganja s eksperimentalnim rezultatima ($R^2 = 0,9895$) što je vidljivo i na **Slici 10.a**.



Slika 10. Koncentracija klorofila a u ekstraktu (Ch-a): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i vremena ekstrakcije (t), za ekstrakciju pri 60 °C

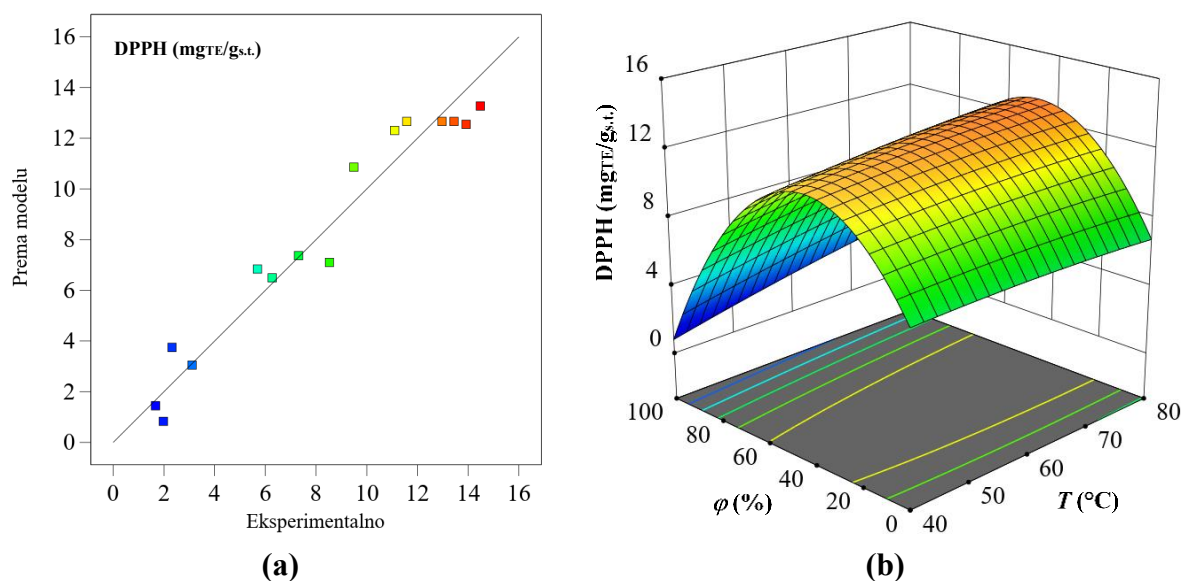
Koncentracija klorofila a (Ch-a) u ekstraktu povećavala se s povećanjem udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu i s povećanjem vremena ekstrakcije te je zabilježeno međuovisno djelovanje koncentracije otapala i vremena ekstrakcije što je vidljivo na **Slici 10.b**. Utjecaj udjela etanola u otapala bilo je veći kako je vrijeme ekstrakcije bilo duže.

Slično kao i kod klorofila a, koncentracija ukupnih karotenoida (TC) u ekstraktu bila je ovisna o udjelu etanola u otapalu te je zabilježeno manje statistički značajno ($0,5 < p < 0,1$) međuovisno djelovanje otapala s vremenom ekstrakcije (**Tablica 6.**). Navedeno je vidljivo i na **Slici 11**.

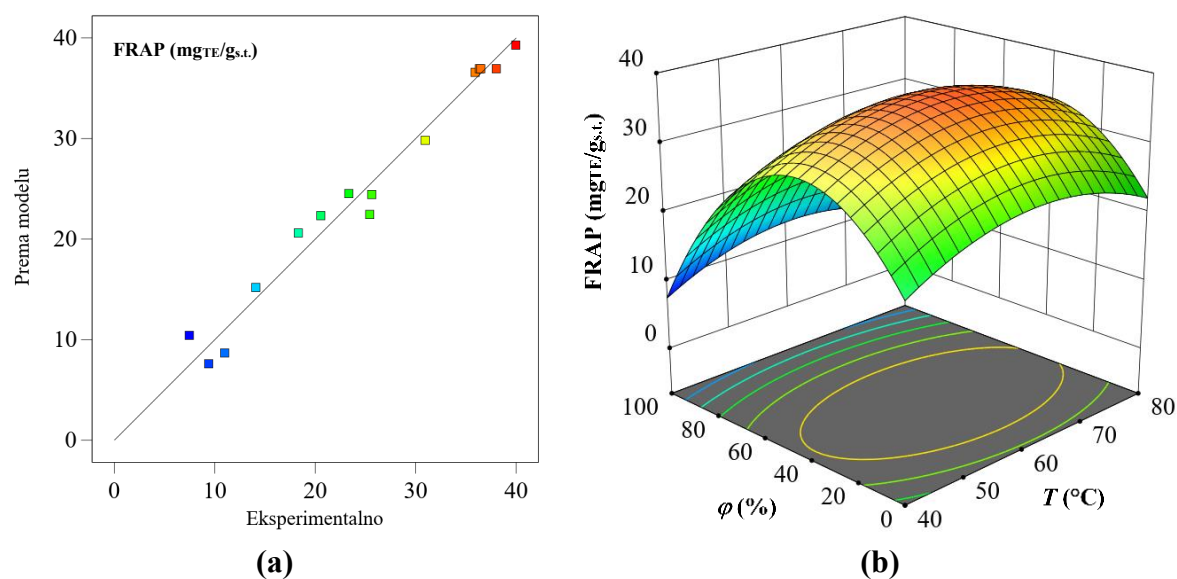


Slika 11. Koncentracija ukupnih karotenoida u ekstraktu (TC): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i temperature ekstrakcije (T), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta

Antioksidacijska aktivnost (AA) ekstrakata određena je prema tri različite anlititičke metode (DPPH, FRAP i ABTS), koje imaju različite principe određivanja ovog svojstva te se stoga moglo očekivati da se rezultati mogu međusobno razlikovati. U ovom slučaju matematički modeli za DPPH i ABTS metodu bili su statistički signifikantni, uz $R^2 = 0,9482$ za DPPH i $R^2 = 0,5103$ za FRAP metodu (**Tablica 5., Slike 12. i 13.**). S druge strane, predloženi matematički modela za ABTS metodu nije statistički signifikantan te se ne može na zadovoljavajući način koristiti za opisivanje funkcionalne ovisnosti antioksidacijske aktivnosti o procesnim parametrima unutar eksperimentalnog područja.



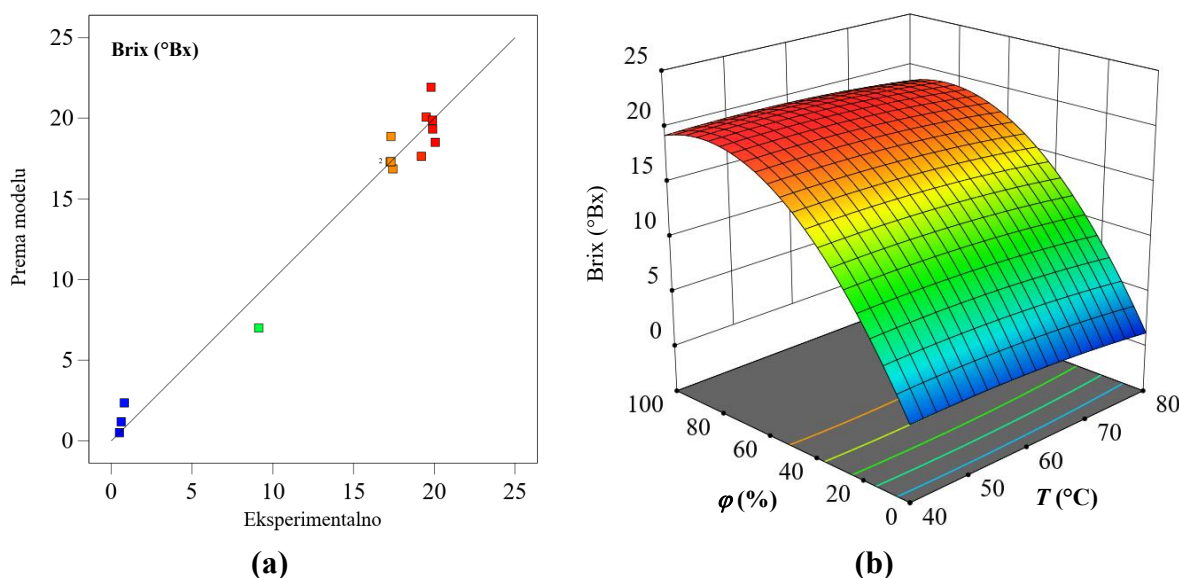
Slika 12. DPPH antioksidacijska aktivnost ekstrakta (DPPH): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i temperature ekstrakcije (T), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta



Slika 13. FRAP antioksidacijska aktivnost ekstrakta (FRAP): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i temperature ekstrakcije (T), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta

Niži udjeli etanola u ekstrakcijskom otapalu imali su pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta, dok je daljnje povećanje udjela etanolala iznad 50 % imao negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta (**Slika 12.b**), za što je odgovoran kvadratni utjecaj ovog procesnog parametra. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta prema FRAP metodi, osim o sastavu otapala ovisila je i o temperaturi (kvadratna uvisnost) te o interakciji između temperature i vremena ekstrakcije (**Tablica 6.**, **Slika 13.b**).

Kao što je već i ranije spomenuto, procesni parametra koji je imao najveći utjecaj ispitivana odzivna svojstva ekstrakta imao je udio etanola u otapalu te je ekstrakt lista koprive dobiven ekstrakcijom s 100 % udjela etanola imao najveću sposobnost loma svjetlost, odnosno imao je najveću koncentraciju izdvojenih topivih tvari iz lista koprive (Slika 14).



Slika 14. Koncentracija otopljenih tvari u ekstraktu (Brix): **(a)** korelacija između eksperimentalno određenih i prema modelu izračunatih vrijednosti; **(b)** 3D odzivna površina kao funkcija udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu (φ) i temperature ekstrakcije (T), za ekstrakciju u trajanju od 20 minuta

4.2. MEĐUSOBNA POVEZANOST KONCENTRACIJE FENOLNIH TVARI, PIGMENATA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U EKSTRAKTU

Međusobna povezanost između odzivnih varijabli određena je korelacijskim koeficijentima (R) čije su vrijednosti prikazane u **Tablici 7**. Snažna pozitivna korelacije ($R > 0,78$) zabilježena je između vrijednosti za TPC i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS), te umjerena pozitivna korelacija između TF i antioksidacijske aktivnosti (R u rasponu 0,3053 – 0,4403). Slijedom navedenog, može se zaključiti da ukupne fenolne tvari imaju snažnije antioksidacijsko djelovanje od ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz lista koprive.

Snažna negativna korelacija ($R = - 0,7669$) između TPC i Ch-a te umjerena negativna korelacija ($R = - 0,5945$) između TPC i TC, kao i umjereno negativna korelacija TF i Ch-a ($R = - 0,4559$) i TC ($R = - 0,3095$) upućuju na zaključak da s porastom koncentracije fenolnih tvari u ekstraktu dolazi do smanjivanja koncentracije pigmenata, i obrnuto.

Tablica 7. Koeficijenti korelacije (R) između pojedinih odzivnih svojstava ekstrakta (TPC, TF, Ch-a, Ch-b, TC, DPPH, FRAP, ABTS, Brix)

	TPC	TF	Ch-a	Ch-b	TC	DPPH	FRAP	ABTS	Brix
TPC	1	0,5763	-0,7669	-0,2085	-0,5945	0,8418	0,8750	0,7843	-0,2459
TF	0,5763	1	-0,4559	-0,1395	-0,3095	0,4403	0,3513	0,3053	-0,4845
Ch-a	-0,7669	-0,4559	1	0,2125	0,8856	-0,6908	-0,6947	-0,4664	0,5474
Ch-b	-0,2085	-0,1395	0,2125	1	0,2196	-0,4989	-0,3051	-0,3588	-0,3360
TC	-0,5945	-0,3095	0,8856	0,2196	1	-0,5171	-0,4923	-0,3515	0,4796
DPPH	0,8418	0,4403	-0,6908	-0,4989	-0,5171	1	0,8732	0,7362	0,0358
FRAP	0,8750	0,3513	-0,6947	-0,3051	-0,4923	0,8732	1	0,8921	-0,0413
ABTS	0,7843	0,3053	-0,4664	-0,3588	-0,3515	0,7362	0,8921	1	0,1534
Brix	-0,2459	-0,4845	0,5474	-0,3360	0,4796	0,0358	-0,0413	0,1534	1

snažna negativna korelacija: (-1,00) – (-0,60)

umjerena negativna korelacija: (-0,60) – (-0,25)

slaba negativna korelacija: (-0,25) – (0,00)

nema korelacije: (0,00)

slaba pozitivna korelacija: (0,00) – (0,25)

umjerena pozitivna korelacija: (0,25) – (0,60)

snažna pozitivna korelacija: (0,60) – (1,00)

Također, s obzirom na snažnu do umjereno snažnu negativnu korelaciju između pigmenta i antioksidacijske aktivnosti može se zaključiti da pigmenti (Ch-a, Ch-b i TC) ne doprinose antioksidacijskom djelovanju ekstrakta.

4.3. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE

Uzimajući u obzir različit utjecaj pojedinog procesnog parametra na pojedinu odzivnu vrijednost ispitivanih svojstava dobivenih ekstrakata te korelaciju između odzivnih svojstava, temeljem dobivenih matematičkih modela provedena je numerička optimizacija s ciljem određivanja uvjeta ekstrakcije koji će biti optimalni za ekstrakciju ciljanih komponenti iz lista koprive. Za numeričku optimizaciju korišten je računalni program Design-Expert v.13 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA).

Za optimiranje procesa ekstrakcije fenolnih tvari iz lista koprive unutar ispitivanog eksperimentalnog raspona procesnih parametar, kao uvjet za numeričku optimizaciju postavljene su ciljane vrijednosti odziva, i to: maksimalna koncentracija TPC i TF u ekstraktu

te maksimalna antioksidacijska aktivnost ekstrakta (DPPH i FRAP). Prema postavljenim uvjetima, procijenjeni su optimalni uvjeti ekstrakcije (OPP-1) kako je navedeno u **Tablici 8**.

Tablica 8. Procijenjeni optimalni uvjeti ekstrakcije antioksidansa iz lista koprive te očekivane koncentracije fenolnih tvari u ekstraktu i antioksidacijska aktivnost ekstrakta

Optimalni procesni parametri (OPP-1)	TPC (mg _{GAE} /g _{s.t.})	TF (mg/g _{s.t.})	DPPH (mg _{TE} /g _{s.t.})	FRAP (mg _{TE} /g _{s.t.})
<i>T</i> (°C)	80	19,411	4,927	13,422
<i>t</i> (min)	5			
<i>φ</i> (%)	43			

Za optimiranje procesa ekstrakcije za ekstrakciju pigmentata iz lista koprive unutar ispitivanog eksperimentalnog raspona procesnih parametar, kao uvjet za numeričku optimizaciju postavljena je maksimalna koncentracija Ch-a u ekstraktu. Prema postavljenim uvjetima, procijenjeni su optimalni uvjeti ekstrakcije (OPP-2) kako je navedeno u **Tablici 9**.

Tablica 9. Procijenjeni optimalni uvjeti ekstrakcije pigmentata iz lista koprive te očekivane koncentracije klorofila a i ukupnih karotenoida ekstrakta

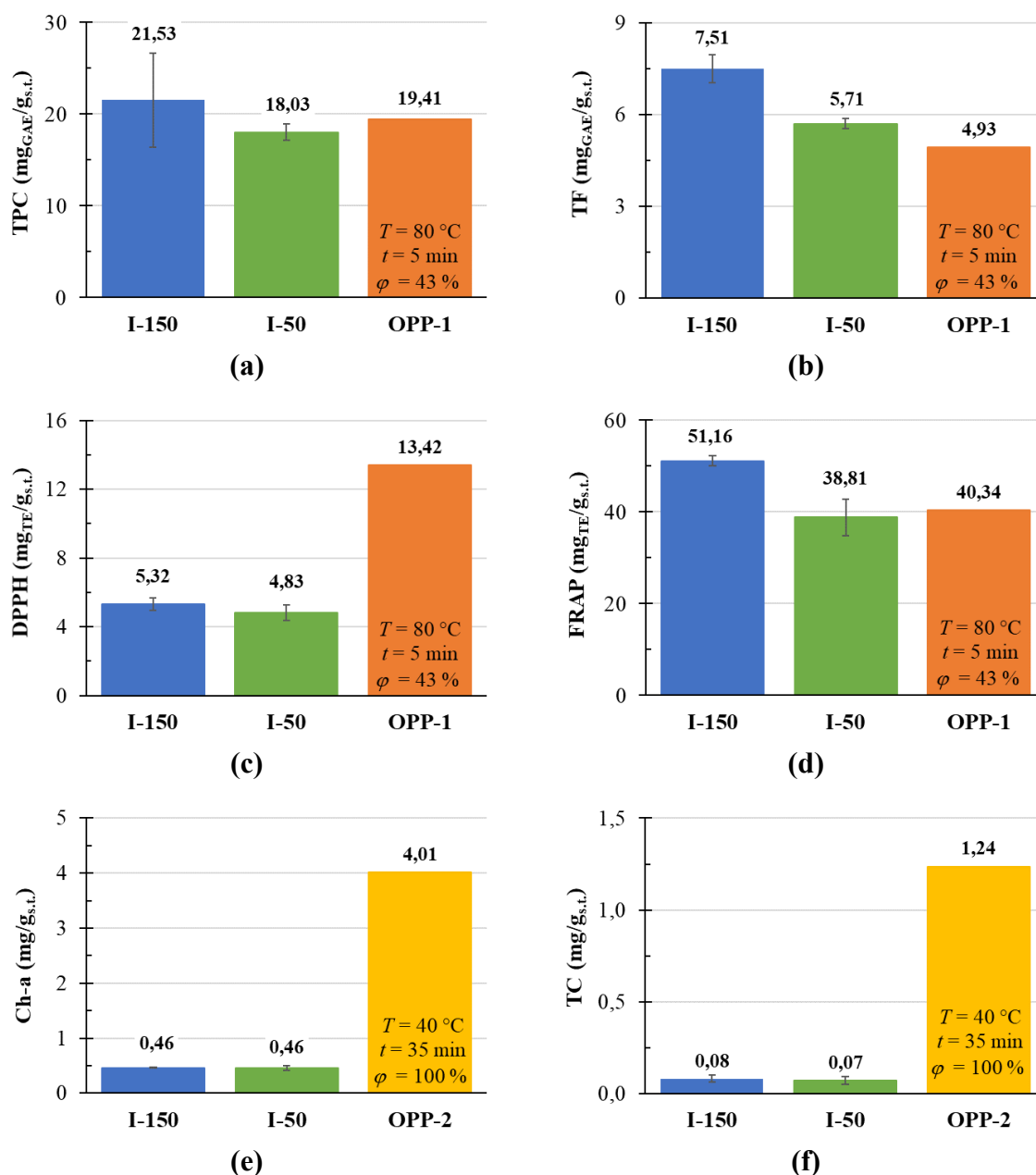
Optimalni procesni parametri (OPP-2)	Ch-a (mg/g _{s.t.})	TC (mg/g _{s.t.})
<i>T</i> (°C)	40	1,237
<i>t</i> (min)	35	
<i>φ</i> (%)	100	

Iz prethodnih tablica, **Tablice 8.** i **Tablica 9.** vidljivo je da različiti procesni uvjeti odgovaraju tvarima koje imaju antioksidacijsko djelovanje (TPC i TF) i pigmentima (Ch-a, TC). Kod ekstrakcije antioksidanasa optimalno je primijeniti višu temperaturu (80 °C) u kombinaciji s kratkim vremenom trajanja procesa (5 min) te udio etanola u vodenom otapalu od 43 % čime se koristi ekstrakcija s polarnijim otapalom. S druge strane, za ekstrakciju pigmentata iz lista koprive optimalni uvjeti ekstrakcije su niža temperatura (40 °C) tijekom dužeg vremena ekstrakcije (35 min) uz manje polarno ekstrakcijsko otapalo (100 % udjela etanola).

4.4. USPOREDBA SVOJSTAVA EKSTRAKTA I VODENE INFUZIJE LISTA KOPRIVE

Radi usporedbe učinka ultrazvukom potpomognute kruto-tekuće ekstrakcije na odzivna svojstva ekstrakta lista koprive, napravljena je usporedba sastava ekstrakata (prema numeričkoj optimizaciji pri optimalnim procesnim parametrima, uzorci OPP-1 i OPP-2) i sastava vodene

infuzije lista koprive dobivene klasičnom metodom pripreme čaja. Priređene su dvije različite vodene infuzije koje su dobivene na način da je 1 g usitnjenog lista koprive prelišen s 150 mL vode temperature 80 °C (uzorak. I-150), odnosno s 50 mL (uzorak. I-50). Nakon 30 min maceracije u lista koprive u poklopljenim posudama, sadržaj posuda je procijeđen te su filtrati (vodene infuzije) analizirani na isti način kao i ekstrakti. Usporedba dobivenih rezultata prikazana je grafički na Slikama 15. i 16.

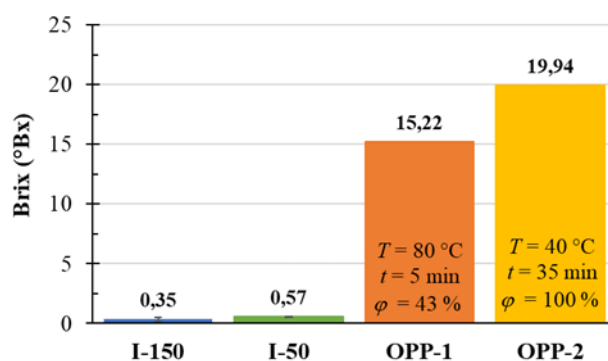


Slika 15. Usporedba sastava vodenih infuzija (I-150; I-50) sa procijenjenim sastavima ekstrakata pri optimalnim uvjetima ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (OPP-1; OPP-2); **(a)** usporedba koncentracija ukupnih fenolnih tvari (TPC); **(b)** usporedba koncentracija ukupnih flavonoida (TF); **(c)** usporedba antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi; **(d)** usporedba antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi; **(e)** usporedba koncentracija klorofila a (Ch-a); **(f)** usporedba koncentracija ukupnih karotenoida (TC)

Međusobno usporedbom vodenih infuzija lista koprive može se uočiti da je u slučaju infuzije priređene maceracijom lista koprive u većem volumenu ekstrakcijskog otapala (I-150) u istom vremenu ekstrahirano nešto više fenolnih tvari (Slika 15.a i 15.b) što se može pripisati većoj brzini ekstrakcije koja je pak bila uvjetovana većom razlikom u koncentraciji fenolnih tvari u glavnoj masi otapala i koncentraciji fenolnih tvari u graničnom sloju. S druge strane, već je prethodno zaključeno da je smanjenje polarnosti otapala, koje se postiglo dodavanjem etanola u vodu, utjecalo na smanjenje ekstraktibilnosti polarnih fenolnih molekula iz lista koprive te je stoga i očekivana koncentracija ovih tvari u ekstraktu OPP-1 niža nego u vodenim infuzijama. Navedeno je vidljivo i u antioksidacijskoj aktivnosti prema FRAP metodi (Slika 15.d), dok je DPPH metodom zabilježena veća antioksidacijska aktivnost ekstrakta nego vodenih infuzija lista koprive (Slika 15.c).

Značajno veća koncentracija pigmentata (Ch-a i TC) očekuje se u ekstraktima lista koprive pri optimalno određenim uvjetima ultrazvukom potpomognute ekstrakcije s voda-etanol otapalom, nego što se to uspjelo ostvariti maceracijom lista koprive u vodi tijekom 30 minuta (Slike 15. b i c).

Kruto-tekuća ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka i otapalo niže polarnosti (veći udio etanola u vodenoj otopini) povećali su koncentraciju ukupno ekstrahiranih (otopljenih) tvari u ekstraktima u odnosu na maceraciju i vodu kao ekstrakcijsko otapalo (Slika 16.).



Slika 16. Usporedba koncentracija otopljenih tvari u vodenim infuzijama (I-150 i I-50) i procijenjenih koncentracija otopljenih tvari u ekstraktima dobivenih pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (OPP-1 i OPP-2)

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Dokazana je učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije kao metode za izdvajanje bioaktivnih tvari iz lista koprive. Korištenje UAE skraćuje vrijeme ekstrakcije i omogućava veću koncentraciju bioaktivnih spojeva u usporedbi s klasičnim metodama, kao što je maceracija.
2. Potvrđen je utjecaj odabranih procesnih parametara ekstrakcije (T , t i udio etanola u otapalu) na ekstrakciju bioaktivnih spojeva.
3. Utvrđeno je da je najveći utjecaj na ekstraktibilnost antioksidanasa, pigmenta i drugih topivih tvari iz lista koprive imao udio etanola u otapalu, pri čemu je veći udio etanola pogodovao boljoj ekstrakciji pigmenta, dok je manji udio etanola u otapalu bio pogodniji za ekstrakciju fenolnih spojeve i postizanje maksimalne AA u ekstraktu.
4. Za opisivanje ovisnosti koncentracije bioaktivnih komponenata o procesnim uvjetima najbolji se pokazao kvadratni model što je potvrđeno statistički značajnim parametrima modela uz visoke koeficijente determinacije, i to za TPC ($R^2 = 0,9608$), Ch-a ($R^2 = 0,9895$), AA_{DPPH} ($R^2 = 0,9482$) i AA_{FRAP} ($R^2 = 0,9756$).
5. Funkcionalna ovisnost koncentracije flavonoida o procesnim parametrima može se opisati linearnim modelom uz nešto niži koeficijent determinacije ($R^2 = 0,5103$), što ukazuje na to je ekstraktibilnost flavonoida iz lista koprive u manjoj mjeri ovisna o složenim interakcijama između procesnih parametara u usporedbi s fenolnim tvarima.
6. Nije pronađena funkcionalna ovisnost koncentracije klorofila b u ekstraktu o procesnim parametrima, odnosno nije predložen matematički model koji bi na adekvatan način mogao opisati navedenu ovisnost unutar eksperimentalnog područja.

6. LITERATURA

- Abou-Arab, A.A. & Abu-Salem, F.M., 2010. Determination of chlorophyll a, b and total carotenoids in plant samples using spectrophotometric methods. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(12), pp.2606-2614.
- Alarcon-Rojo, A.D., Janacua-Vidales, H. & Morales-Cortez, M., 2013. Ultrasound and meat quality: A review. *Journal of Food Quality*, 36(2), pp.174-182.
- Al-Snafi, A.E., 2015. The chemical constituents and pharmacological effects of *Urtica dioica*: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10), pp.8-16.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. & Gilani, A.H., 2007. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), pp.17-25.
- Awad, A.B. & Fink, C.S., 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 130(9), pp.2127-2130.
- Barba, F.J., Putnik, P. & Santoro, A., 2015. Spectrophotometric methods for the determination of chlorophylls and carotenoids in plant materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(3), pp.239-258.
- Begić, S., Horozić, E. et al., Antioxidant capacity and total phenolic and flavonoid contents of methanolic extracts of *Urtica dioica* L. by different extraction techniques.
- Bermudez-Aguirre, D. & Barbosa-Cánovas, G.V., 2011. Study of processing conditions of ultrasound on the inactivation of microorganisms in fresh carrot juice and an improving method of ultrasound performance. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), pp.366-373.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D. 2024. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69(3), pp. 164-169.
- Bisht, S. & Bhandari, S., 2018. Nutritional and medicinal potential of *Urtica dioica*: A review. *Journal of Herbal Medicine*, 13, pp.27-35.
- Booth, S.L., 2009. Vitamin K: Food composition and dietary intakes. *Food & Nutrition Research*, 53(1), pp.1-7.
- Bouic, P.J., 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: A review of the past 10 years. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 4(6), pp.471-475.
- Bucić-Kojić, A., 2008. The effect of process conditions and method of solid-liquid extraction on extractability of phenolic compounds from grape seeds. Doctoral thesis.
- Carr, A.C. & Maggini, S., 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), p.1211.
- Chemat, F., Abert-Vian, M. & Zill-E-Huma, 2017. Ultrasound-assisted extraction in the food industry: A review. *Food Chemistry*, 258, pp.369-385.
- Chemat, F., Zill-E-Huma & Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), pp.813-835.
- Dar, S.A., Ganai, F.A., Yousuf, A.R., Balkhi, M.U., Bhat, T.M. & Sharma, P., 2013. Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmacology & Pharmacy*, 51(2), pp.170-180. Available at: <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.715172>

- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., di Lonardo, S., Praczyk, M. & Wielgusz, K., 2015. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products*, 68, pp.42-49.
- Durović, S., Pavlić, B., Zeković, Z. & Vidović, S., 2017. Optimization of the extraction process of bioactive compounds from nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Hemijska Industrija*, 71(1), pp.61-68.
- Ferruzzi, M.G. & Blakeslee, J., 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27(1), pp.1-12.
- Fraser, P.D. & Bramley, P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), pp.228-265.
- Garmendia, A., Raigón, M.D., Marques, O., Ferriol, M., Royo, J. & Merle, H., 2018. Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. *PeerJ*, 6, p.e4729.
- Grauso, L., Formisano, C., Rigano, D. & Senatore, F., 2020. Phytochemical composition, biological activity, and health benefits of *Urtica dioica* L. *Natural Product Communications*, 15(11), pp.1-13.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M. & Büyükokuroğlu, M.E., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3), pp.205-215.
- Hodak, B., 2019. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta hrane. Diplomski rad.
- Hulina, N., 2011. Više biljke stablašice. Sistematika i gospodarsko značenje. Golden Marketing-Tehnička Knjiga, Zagreb.
- Ji, T.F., Liu, C.H., Wang, A.G., Yang, J.B., Su, Y.L., Yuan, L., & Feng, X.Z., 2007. Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. *Zhong Yao Cai*, 30(6), pp.662-664.
- Jolić, N., Skroza, D., Šimat, V., Vrdoljak, L., Skelin, A., Čagalj, M., Frleta, R. & Generalić Mekinić, I., 2022. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among phenolic acids in the model matrices using FRAP and ORAC methods. *Antioxidants*, 11(9), p.1784. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11091784>
- Kennedy, D.O., 2016. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. *Nutrients*, 8(2), p.68.
- Kregiel, D., Pawlikowska, E. & Antolak, H., 2018. *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), pp.1-21.
- Marinova, E., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). "Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian medicinal plants." *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
- Mason, T.J. & Lorimer, J.P., 2002. Sonochemistry: Theory, applications and uses of ultrasound in chemistry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(2), pp.122-128.
- McClements, D.J., 2005. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. CRC Press.
- Meyer, U., McDowell, L.R. & Williams, S.N., 2006. Herbal medicinal products: Scientific basis of use. In *Nutritional Aspects of Herbology* (pp.45-60). Springer.
- Mujić, 2006. Ekstrakcija i ekstraktori biljnih materijala. Biotehnički fakultet, Bihać.

- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M. & Mimica-Dukić, N., 2014. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, pp.48-53.
- Otles, S. & Yalcin, B., 2012. Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. In *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, pp.1402-1408.
- Popescu, C., Pruteanu, A., Voicea, I., Ivancu, B., Gageanu, G., Popa, L., Vladut, V., 2014. Study regarding biochemical characterization and some preparations from nettle and wormwood in order to capitalize them as bioinsecticide/biofertilizers in organic agriculture. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 44(2), pp.175-185.
- Raso, J. & Heinz, V., 2006. *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*. Springer.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A. & Yang, M., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), pp.1231-1237.
- Rogić, M., 2014. Analiza antioksidativnog kapaciteta različitih biljnih ekstrakata. Diplomski rad.
- Sumanta, K.K., Roy, A.N., Baite, H., Debnath, S., Ammayappan, L., Nayak, L.K., Singha, A. & Kundu, T.K., 2021. Applications of nettle fibre in textile: A brief review. *International Journal of Bioresource Science*, 8(1), pp.39-45.
- Shalaby, E.A. & Shanab, S.M.M., 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), pp.528-539.
- Soria, A.C. & Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), pp.323-331.
- Šelo G: Razvoj procesa biološke obrade i funkcioniranja tropa grožđa u svrhu proizvodnje fenolnih spojeva. Disertacija, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2022.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D., 2006. Preparation and characterization of Trolox standard solution for antioxidant assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), pp.8855-8860.
- Upton, R., 2013. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 3, pp.9-38.
- Villamiel, M. & de Jong, P., 2000. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), pp.472-478.
- Wang, X.D., 2012. Carotenoid metabolism in animals. In *Carotenoids and Human Health* (pp.49-63). Humana Press.
- Wilt, T.J., MacDonald, R., Ishani, A. & Rutks, I., 1999. Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: A systematic review. *BJU International*, 83(9), pp.976-983.
- Yin, Y., Xing, H. & Ye, J., 2009. Efficacy and safety of phytosterols supplementation in hypercholesterolemic patients: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(4), pp.334-346.

- Zeković, Z., Pavlić, B. & Pestić, M., 2018. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Urtica dioica* L. *Industrial Crops and Products*, 121, pp.160-167.
- Zheleva-Dimitrova, D., 2010. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris* natural product in infertility therapy. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), pp.193-199.