

## UTICAJ PROCESNIH PARAMETARA NA SADRŽAJ (POLI)FENOLA PRI RAZLIČITIM POSTUPCIMA EKSTRAKCIJE LISTA BOROVNICE

### INFLUENCE OF PROCESS PARAMETERS ON (POLY)PHENOL CONTENT DURING DIFFERENT BLUEBERRY LEAF EXTRACTION PROCEDURES

**Milica Bučkić\*, Vladan Mičić, Nebojša Vasiljević**

Tehnološki fakultet Zvornik, Univerzitet u Istočnom Sarajevu,  
Karakaj, Zvornik

*Borovnica je višegodišnja, žbunasta biljka koja je izuzetno bogata fenolnim komponentama, koje su značajne za njenu antioksidativnu aktivnost kao „hvatači” radikala. Cilj rada je da se ispita uticaj procesnih parametara pri različitim postupcima ekstrakcije lista borovnice na sadržaj (poli)fenola. Kao ekstrakcione tehnike korišćene su maceracija, mešanje na šejkeru i ultrazvučna ekstrakcija kao primeri klasičnih i savremenog tipa izvođenja ekstrakcije, a procesni parametri koji su praćeni su uticaj broja obrtaja, koncentracija rastvarača, uticaj vremena, pH vrednost i odnos biljni materijal: rastvarač (čvrsto:tečnost). Kao ekstrakciono sredstvo je korišćen etanol. Sadržaj ukupnih (poli)fenolnih jedinjenja određen je korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa, sadržaj flavonoida korišćenjem aluminijum-hlorida, a sadržaj antocijana korišćenjem pH diferencijalne metode. Rezultati rada su pokazali da na ekstrakciju lista borovnice značajno utiču varijable procesa, kao i da se ultrazvučnom ekstrakcijom dobijaju kvalitetniji ekstrakti.*

**Ključne reči:** *antioksidativnost; borovnica; procesni parametri; (poli)fenolna jedinjenja*

*Blueberry is a perennial, bushy plant that is extremely rich in phenolic components, which are significant for its antioxidant activity as "catchers" of radicals. The aim of this work is to examine the influence of process parameters during different blueberry leaf extraction procedures on the (poly)phenol content. As extraction techniques, maceration, mixing on a shaker and ultrasound-assisted extraction were used as examples of classic and modern types of extraction, and the process parameters that were monitored were the influence of the number of revolutions, ethanol content in solvent, influence of time, pH value and plant material-to-solvent ratio (solid-to-solvent ratio). Ethanol was used as an extraction agent. The content of total (poly)phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, the flavonoid content using aluminum chloride, and the anthocyanin content using the pH differential method. The results of the work showed that the extraction of blueberry leaves is significantly influenced by process variables, as well as that higher quality extracts are obtained by ultrasound-assisted extraction.*

**Key words:** *antioxidant activity; blueberry; process parameters; (poly)phenolic compounds*

\* Corresponding author:  
milicabuckic92@gmail.com

Vladan Mičić: <https://orcid.org/0000-0002-4383-4879>  
Nebojša Vasiljević: <https://orcid.org/0000-0002-3789-9975>

## 1. Uvod

Borovnica (*Vaccinium myrtillus*) je višegodišnja biljka koja pripada gupi skrivenosemenica [1]. Ova žbunasta biljna vrsta je bogata nutritivnim materijama i fitohemikalijama. Od fitohemikalija posebno se izdavaju (poli)fenolna jedinjenja. Ova jedinjenja doprinose kvalitetu voća i povrća, a posebno se ističu zbog svoje antioksidacione aktivnosti [2-6]. Polifenoli deluju kao "hvatači" slobodnih radikala pri čemu doprinose prevenciji od bolesti poput kancera, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja [6].

Kada je reč o biljnim fenolnim jedinjenja, borovnica se ističe po visokom sadržaju flavonoida i antocijana, šta više ona ima najveći sadržaj antocijana u poređenju sa drugim voćem. Nedavna istraživanja naglašavaju poseban interes za antocijane zbog njihovih bezbednih svojstava i potencijalne primene kao promotora u karcinogenezi [6]. Antocijani su pigmenti koji zrelim bobicama daju crvenu, plavu i ljubičastu boju. Koncentracija antocijanina u bobicama se brzo povećava tokom zrenja, pružajući vizuelnu indikaciju za razlikovanje između ranog i potpuno zrelog voća [6]. Opseg ekvivalenata cijanidin-3-glukozida/g sveže mase [Cy3G/g] 215 genotipova borovnice bio je od 0,925 do 2,1 mg [7].

Izolacija (poli)fenolnih jedinjenja najčešće se izvodi ekstrakcionim tehnikama. Za razliku od konvencionalnih tehnika koje se odlikuju velikim utroškom biljnih materijala i upotrebom organskih rastvarača što ne doprinosi održivosti procesa, nekonvencionalne (savremene) tehnike su ekološki prihvatljive, brze i pojeftinjuju proces.

Ekstrakcija rastvaračem, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ultrazvučna ekstrakcija (UAE) i ekstrakcija superkritičnim fluidima su najčešće korišćene metode za ekstrakciju antocijanina borovnice [8]. Među njima, ultrazvučna ekstrakcija ima primarni značaj jer je efikasna, isplativa i ekološki prihvatljiva. Upotreba ultrazvuka u ekstrakciji ima značaj jer može da generiše kavitaciju i ubrza dezintegraciju biljnih ćelija, čineći prenos mase efikasnijim [9].

Vinčić [6] je u svom radu utvrdila da ekstrakt borovnice ima najizraženiju antioksidativnu aktivnost na  $O_2^{\bullet-}$  radikale, u odnosu na malinu i kupinu. Vasiljević i saradnici [10] su utvrdili da veći sadržaj etanola u rastvaraču omogućava bolju ekstrakciju samo antocijanina, ali ne i ukupnih (poli)fenola i flavonoida. Optimalna koncentracija etanola prema njihovom istraživanju se kretala u rasponu od 50,61 – 51,21% v/v. Razlog za ovo najverovatnije leži u činjenici da rastvarač lakše prodire u biljni materijal pri srednjem sadržaju etanola. Ukupni (poli)fenoli i antocijanini se ekstrahuju u većim odnosima čvrsta materija:rastvarač, jer je njihova brzina difuzije veća pri tako visokim odnosima; međutim, flavonoidi se ekstrahuju pri znatno nižim odnosima čvrsta materija:rastvarač, najverovatnije zato što druga jedinjenja ograničavaju njihovu difuziju.

U radu je ispitan uticaj procesnih parametara pri različitim postupcima ekstrakcije lista borovnice na sadržaj (poli)fenola. Ekstrakcija lista borovnice vršena je maceracijom, mešanjem na šejkeru i ultrazvukom pri različitim frekvencijama oscilovanja, vremenu ekstrakcije, pH vrednosti, odnosu biljnog materijala i rastvarača i koncentracijama etanola kao rastvarača.

## 2. Eksperimentalni deo

Za ekstrakciju osušenih listova borovnice korišćen je rastvor etanola. Nakon završene ekstrakcije, spektrofotometrijski je određen je sadržaj ukupnih (poli)fenola, flavonoida i antocijanina u dobijenim ekstraktima na spektrofotometru Shimadzu UV-1800 (Cole Parmer, SAD). Merenje ukupnih (poli)fenola je rađeno na talasnoj dužini od 765 nm, a kao standard je korišćena galna kiselina (Sigma Aldrich, USA) [11]. Za spektrofotometrijsko merenje korišćeni su sledeći reagensi: Folin-Ciocalteu reagens (Carlo Erba, Nemačka), kao i natrijum-karbonat (Lach:ner, Češka Republika).

Metoda se temelji na oksidacijsko-redukcijskim procesima između hidroksilnih grupa fenola i Folin-Ciocalteu reagensa, polimernog kompleksnog jona molibdena i volframa.

Sadržaj flavonoida u uzorku određivan je kolorimetrijskom metodom s aluminijum-hloridom. Aluminijum iz aluminijum-hlorida stvara stabilne komplekse u kiselom mediju sa C-4 keto grupom ili C-3 i C-5 hidroksilnom grupom prisutnih flavona i flavonola, a nestabilne komplekse sa ortodi-hidroksilnim grupama u A ili B prstenu flavonoida. Merenje je vršeno na talasnoj dužini od 510 nm, sa katehin-hidratom (Sigma Aldrich, SAD) kao standardom [12]. Za razvoj boje korišćeni su aluminijum-hlorid (Lach:ner, Češka), natrijum-hidroksid (Lach:ner, Češka) i natrijum-nitrit (Zorka Šabac, Srbija).

Sadržaj antocijana je određen merenjem apsorpcije kalijum-hloridnog pufera pH = 1 i acetatnog pufera pH = 4,5, na talasnoj dužini od 520 nm i 700 nm [13,14]. Kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva se na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promena apsorpcionog spektra. Tokom vremena, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik, vitamin C i dr.) dolazi do degradacije monomera antocijana, koji se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima, formirajući na taj način proizvode razgradnje. Iako količina monomera antocijana opada, intenzitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije nastaju obojeni kondenzacioni proizvodi koji su čak i stabilniji nego monomeri (slobodni) antocijani.

Sadržaj ukupnih (poli)fenola, flavonoida i antocijana u ekstraktu je izražen kao ekvivalent galne kiseline [mg GAE/g], ekvivalent katehin-hidrata [mg KaH/g] i ekvivalent cijanidin-3-glukozida [Cy3G/g], respektivno.

### 3. Rezultati i diskusija

Vreme ekstrakcije i frekvencija oscilovanja su ispitivani mešanjem na šejkeru, a kao referentne vrednosti parametara su uzete sledeće vrednosti:

- Koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v,
- Odnos biljna droga:rastvarač 1:40 m/v i
- pH = 7.

U tabeli 1 prikazan je kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta nastao mešanjem na šejkeru u zavisnosti od vremena ekstrakcije i frekvencije oscilovanja.

Iz tabele 1 se može uočiti da se pri frekvenciji oscilacija 100 o/min ispitivao uticaj vremena na (uzorci 1-7) sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i koncentraciju ukupnih antocijana. Ekstrakcija je vršena u trajanju od 10, 20, 35, 60, 90, 120 i 180 min. Pri vremenu od 25 min ispitivao se uticaj na frekvencije oscilovanja u šejkeru (uzorci 8-14). Ekstrakcija je izvođena pri frekvencijama 25, 50, 75, 100, 130, 160 i 200 o/min.

Za uzorke 1-7 uočava se da sadržaj ukupnih fenola raste sa vremenom ekstrakcije. Od 120 min vrednost sadržaja ukupnih fenola opada. Od 20 do 90 min rast sadržaja ukupnih fenola je mali.

Slično tome i sadržaj ukupnih flavonoida rastao je sa vremenom ekstrakcije. Najveći rast se uočava između 20 i 90 min. Kada je reč o koncentraciji ukupnih antocijana, ona je približno ista na 20 i 60 min i iznosi oko 0,08 mg Cy3G/g. Od 60 min koncentracija ukupnih antocijana raste, da bi od 120 min koncentracija počela da opada, što bi značilo da dolazi do uspostavljanja hemijske ravnoteže. Iz ovoga sledi da je optimalno vreme ekstrakcije 25 min.

Za uzorke 8-14, kod kojih se ispitivao uticaj frekvencije oscilovanja na proces ekstrakcije, uočava se da je najveća vrednost sadržaja ukupnih fenola dobijena primenom 50 i 75 o/min. Najveća vrednost sadržaja flavonoida (16,99 mg KaH/g) dobijena je pri frekvenciji oscilovanja 50 o/min, dok

je koncentracija ukupnih antocijana najveća pri 200 o/min. Nešto niža koncentracija antocijana se dobija pri 50 o/min i iznosi oko 0,08 mg Cy3G/g te se uočava da je optimalna frekvencija oscilovanja 50 o/min.

*Tabela 1. Kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta nastao mešanjem na šejkeru u zavisnosti od vremena ekstrakcije i frekvencije oscilovanja*

Oznaka uzorka	Vreme reakcije [min]	Frekvencija oscilovanja [o/min]	Sadržaj ukupnih fenola [mg GAE/g]	Sadržaj ukupnih flavonoida [mg KaH/g]	Koncentracija ukupnih antocijana [mg Cy3G/g]
1	10	100	37,53	10,32	0,0681
2	20	100	39,19	10,52	0,0815
3	35	100	42,98	13,48	0,0748
4	60	100	47,70	15,89	0,0855
5	90	100	50,70	19,40	0,0948
6	120	100	59,36	20,72	0,1122
7	180	100	55,28	20,92	0,1109
8	25	25	39,57	11,76	0,0561
9	25	50	49,28	16,99	0,0775
10	25	75	49,28	12,08	0,0588
11	25	100	47,37	10,80	0,0615
12	25	130	39,26	13,57	0,0721
13	25	160	43,80	13,92	0,0668
14	25	200	48,48	16,77	0,0802

Nakon što je određena optimalna frekvencija oscilovanja (50 o/min) i optimalno vreme ekstrakcije (25 min) pristupilo se ispitivanju uticaju koncentracije etanola u rastvaraču, odnosa biljna droga:rastvarač i pH vrednosti primenom maceracije, mešanja na šejkeru i ultrazvučne ekstrakcije kao ekstrakcionih tehnika.

### 3.1. Maceracija

U tabeli 2 prikazan je kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen maceracijom u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač, koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti. Za ispitivanje odnosa biljna droga:rastvarač (uzorci 15-17) kao referentna vrednost je korišćena koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/v i pH = 7.

Pri ispitivanju koncentracije alkohola u rastvaraču (uzorci 16, 18, 19) kao referentne vrednosti su uzete odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v pri pH = 7, dok pri ispitivanju pH vrednosti (uzorci 16, 20, 21) na sastav ekstrakta kao referentne vrednosti su uzete koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/v i odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v.

*Tabela 2. Kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen maceracijom u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač, koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti*

Oznaka uzorka	Odnos [m/v]	Koncentracija etanola [%]	pH [/]	Sadržaj ukupnih fenola [mg GAE/g]	Sadržaj ukupnih flavonoida [mg KaH/g]	Koncentracija ukupnih antocijana [mg Cy3G/g]
15	1:20	50	7	30,65	13,61	0,0554
16	1:40	50	7	45,67	18,60	0,0975
17	1:60	50	7	46,54	18,13	0,0781
18	1:40	25	7	44,09	18,44	0,0294
19	1:40	75	7	34,90	12,80	0,3407
20	1:40	50	3	39,41	14,61	0,0882
21	1:40	50	11	46,54	19,24	0,0922

Prilikom ispitivanja odnosa biljna droga:rastvarač (uzorci 15-17) primećeno je da se pri odnosima biljna droga:rastvarač 1:40 i 1:60 m/v postiže gotovo identičan sadržaj ukupnih fenola (45,67 i 46,54 mg GAE/g respektivno). Suprotno tome, primenom odnosa biljna droga:rastvarač 1:20 m/v, beleži se značajno niža vrednost. Što se tiče ukupnih flavonoida, uočava se da se pri odnosima biljna droga:rastvarač od 1:40 i 1:60 m/v postiže sličan sadržaj (nešto iznad 18 mg KaH/g), dok je primena odnosa 1:20 m/v rezultirala znatno manjom vrednošću. Koncentracija ukupnih antocijana je najveća pri odnosu biljna droga:rastvarač 1:40 m/v (0,0975 mg Cy3G/g).

Kod uzoraka 16, 18 i 19 kod kojih je ispitivan uticaj etanola u rastvaraču može se uočiti da se najveći sadržaj ukupnih fenola dobija primenom koncentracije etanola u rastvaraču 50% v/v. Malo niži sadržaj ukupnih fenola uočava se i primenom najniže koncentracije etanola u rastvaraču (44,09 mg GAE/g).

Najveći sadržaji ukupnih flavonoida dobijen je primenom koncentracije etanola u rastvaraču 25 i 50% v/v, dok je koncentracija antocijana najveća upotrebom koncentracije etanola u rastvaraču 75% v/v. Znatno niže koncentracija antocijana se dobijaju pri upotrebi 25% v/v i 50% v/v etanola u rastvaraču.

Uticaj promene pH vrednosti je ispitivan kod uzoraka 16, 20 i 21. Najviši sadržaj ukupnih fenola dobijen je izvođenjem reakcije u baznoj sredini (pH = 11) Slično tome i sadržaj ukupnih flavonoida smanjivao se od bazne sredine ka kiseloj sredini.

Najveća koncentracija ukupnih antocijana dobijena je u neutralnoj sredini, dok je nešto niža vrednost koncentracije ukupnih antocijana dobijena pri pH = 11.

Iz tabele 2 može se zaključiti da su optimalni uslovi za maceraciju sledeći:

- vreme izvođenja 25 min,
- koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:40 m/v i
- pH = 11.

Pri takvim uslovima dobija se da je sadržaj ukupnih fenola 46,54 mg GAE/g, ukupnih flavonoida 19,24 mg KaH/g i koncentracija ukupnih antocijana je 0,0922 mg Cy3G/g.

### 3.2. Mešanje na šejkeru

U tabeli 3 prikazan je kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen mešanjem u šejkeru u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač, koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti. Za ispitivanje odnosa biljna droga:rastvarač (uzorci 22-24) kao referentna vrednost je korišćena koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/v pri pH = 7.

Pri ispitivanju koncentracije alkohola u rastvaraču (uzorci 23, 25, 26) kao referentne vrednosti su uzete odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v pri pH = 7, dok pri ispitivanju pH vrednosti (uzorci 23, 27, 28) na sastav ekstrakta, kao referentne vrednosti su uzete koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/ i odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v. Frekvencija oscilovanja na šejkeru je bila 50 o/min.

Prilikom analize uzoraka 22-24, istražen je uticaj različitih odnosa biljne droge i rastvarača na sadržaj ukupnih fenola. Primećeno je da sadržaj ukupnih fenola raste proporcionalno povećanju odnosa biljna droga:rastvarač. Najveća koncentracija ukupnih fenola zabeležena je pri odnosu biljna droga:rastvarač 1:60 m/v (52,03 mg GAE/g). Što se tiče ukupnih flavonoida, najviša vrednost zabeležena je pri odnosu biljna droga:rastvarač 1:60 m/v, dok su pri odnosima 1:20 i 1:40 m/v dobijene slične vrednosti (15,89 i 15,08 mg KaH/g, redom). Takođe je primećeno da se pri najnižem odnosu biljna droga:rastvarač postiže najveća koncentracija ukupnih antocijana (0,0561 mg Cy3G/g).

Tabela 3. Kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen mešanjem u šejkeru u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač, koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti

Oznaka u-zorka	Odnos [m/v]	Koncentracija etanola [%]	pH [/]	Sadržaj ukupnih fenola [mg GAE/g]	Sadržaj ukupnih flavonoida [mg KaH/g]	Koncentracija ukupnih antocijana [mg Cy3G/g]
22	1:20	50	7	34,05	15,89	0,0561
23	1:40	50	7	41,03	15,08	0,0427
24	1:60	50	7	52,03	17,76	0,0441
25	1:40	25	7	45,40	17,62	0,2365
26	1:40	75	7	39,02	15,01	0,2044
27	1:40	50	3	46,84	18,84	0,0721
28	1:40	50	11	49,40	20,80	0,0761

Prilikom ispitivanja uticaja koncentracije etanola u rastvaraču (uzorci 23, 25, 26) uočava se da sa porastom koncentracije etanola u rastvaraču opada sadržaj ukupnih fenola, dok je najveći sadržaj ukupnih flavonoida (17,62 mg KaH/g) dobijen korišćenjem 25% v/v etanola u rastvaraču,. Najveća koncentracija ukupnih antocijana (0,2365 mg Cy3G/g) dobijena je pri 25% v/v etanola u rastvaraču, dok je najniža koncentracija ukupnih antocijana (0,0427 mg Cy3G/g) dobijena pri upotrebi 50% v/v etanola u rastvaraču.

Uticaj primene pH vrednosti je ispitana kod uzoraka 23, 27 i 28. Iz tabele 3 vidi se da je sadržaj ukupnih fenola najveći pri izvođenju ekstrakcije na pH = 11 i iznosi 49,40 mg GAE/g, dok je najniži pri izvođenju ekstrakcije u neutralnoj sredini. Sadržaj ukupnih flavonoida je najveći (20,80 mg KaH/g) pri izvođenju reakcije u baznoj sredini, a najniži pri izvođenju ekstrakcije u neutralnoj sredini. Koncentracija ukupnih antocijana je najveća u baznoj sredini i iznosi 0,0761 mg Cy3G/g.

Iz tabele 3 uočava se da su optimalni uslovi za izvođenje ekstrakcione tehnike mešanje na šeikeru za ekstrakciju lista borovnice sledeći:

- vreme reakcije 25 min,
- frekvencija oscilovanja 50 o/min,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:40 m/v,
- koncentracija etanola u rastvaraču 25% v/v i
- pH = 11.

### 3.3. Ultrazvučna ekstrakcija

U tabeli 4 prikazan je kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (UAE) u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti. Za ispitivanje odnosa biljna droga:rastvarač (uzorci 29-31) kao referentna vrednost je korišćena koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/v pri pH = 7.

Pri ispitivanju koncentracije alkohola u rastvaraču (uzorci 30, 32, 33) kao referentne vrednosti su uzete odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v pri pH = 7, dok pri ispitivanju pH vrednosti (uzorci 30, 34, 35) na sastav ekstrakta, kao referentne vrednosti su uzete koncentracija alkohola u rastvaraču 50% v/v i odnos biljna droga:rasvarač 1:40 m/v.

*Tabela 4. Kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (UAE) u zavisnosti od odnosa biljna droga:rastvarač, koncentracije etanola u rastvaraču i pH vrednosti*

Oznaka uzorka	Odnos [m/v]	Koncentracija etanola [%]	pH [°]	Sadržaj ukupnih fenola [mg GAE/g]	Sadržaj ukupnih flavonoida [mg KaH/g]	Koncentracija ukupnih antocijana [mg Cy3G/g]
29	1:20	50	7	30,68	14,14	0,0708
30	1:40	50	7	46,44	19,29	0,1456
31	1:60	50	7	60,18	19,41	0,2064
32	1:40	25	7	36,38	14,22	0,0574
33	1:40	75	7	40,35	16,96	0,6359
34	1:40	50	3	43,49	16,69	0,1777
35	1:40	50	11	49,24	21,65	0,4115

Kod uzoraka 29-31 ispitivan je uticaj odnosa biljna droga:rastvarač i uočeno je da sa porastom odnosa biljna droga:rastvarač raste i sadržaj ukupnih fenola. Korišćenjem odnosa biljna droga:rastvarač 1:40 i 1:60 m/v dobija se nešto iznad 19 mg KaH/g ukupnih flavonoida. Sa porastom odnosa biljna droga:rastvarač raste koncentracija ukupnih antocijana, najveća koncentracija ukupnih antocijana (0,206 mg Cy3G/g) se dobija korišćenjem odnosa biljna droga:rastvarač 1:60 m/v.

Prilikom ispitivanja uticaja koncentracije etanola u rastvaraču (uzorci 30, 32, 33) uočava se da je najveći sadržaj ukupnih fenola (46,44 mg GAE/g) dobijen upotrebom 50% v/v etanola u rastvaraču. Najveći sadržaj ukupnih flavonoida (19,29 mg KaH/g) dobija se korišćenjem 50% v/v etanola u rastvaraču, dok se najveća koncentracija ukupnih antocijana (0,6359 mg Cy3G/g) dobija upotrebom 75% v/v etanola u rastvaraču. Sa porastom koncentracije etanola u rastvaraču raste i koncentracija ukupnih antocijana.

Uticaj promene pH vrednosti je ispitana kod uzoraka 30, 34 i 35. Iz tabele 4 vidi se da sa porastom pH vrednosti raste i sadržaj ukupnih fenola. Pri pH = 11 dobija se najveći sadržaj ukupnih fenola koji iznosi 49,24 mg GAE/g. Najviši sadržaj ukupnih flavonoida (21,65 mg KaH/g) dobijen je u baznoj sredini. Sa porastom pH vrednosti raste i sadržaj ukupnih flavonoida, dok je koncentracija ukupnih antocijana najveća (0,4155 mg Cy3G/g) pri pH = 11.

Iz tabele 4 uočava se da su optimalni uslovi za izvođenje ultrazvučne ekstrakcije sledeći:

- vreme ekstrakcije 25 min,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:60 m/v,
- koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v i
- pH = 11.

### 3.4. Poređenje ekstrakcionih tehnika za ekstrakciju listova borovnice

Tabele 2, 3 i 4 su pokazale da se optimalni parametri kod svih primenjenih ekstrakcionih tehnika razlikuju. Istraživanja koja su sprovedena u ovom radu su pokazala da se najbolji rezultati dobijaju primenom sledećih parametara kod:

#### 1) maceracije

- vreme ekstrakcije 25 min,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:40 m/v,
- koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v i
- pH = 11,

#### 2) mešanje na šejkeru

- vreme ekstrakcije 25 min,
- frekvencija oscilovanja 50 o/min,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:40 m/v,
- koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v i
- pH = 11,

#### 3) ultrazvučna ekstrakcija

- vreme ekstrakcije 25 min,
- odnos biljna droga:rastvarač 1:60 m/v
- koncentracija etanola u rastvaraču 50% v/v i
- pH = 7.

## 4. Zaključak

Najveći sadržaj ukupnih fenola dobijen je primenom ultrazvučne ekstrakcije (60,18 mg GAE/g).

Sadržaj ukupnih flavonoida nije mnogo zavisio od primenjenih ekstrakcionih tehnika i kretao se od 19,24,-20,80 mg KaH/g.

U pogledu sadržaja ukupnih antocijana daleko najveći prinos od 0,2064 mg Cy3G/g je dobijen primenom ultrazvučne ekstrakcije.

Na osnovu izvršenih istraživanja prilikom poređenja datih ekstrakcionih tehnika došlo se do zaključka da je ultrazvučna ekstrakcija najpodesnija metoda. Primenom date ekstrakcione metode pored najvećeg sadržaja fenola i antocijana pokazano je i da se može koristiti najmanja količina biljnog materijala u odnosu na druge dve tradicionalne metode čime se postiže i ušteda u pogledu potrošnje biljnog materijala.



## 5. Literatura

- [1] **Vračar, Lj.**, Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2001.
- [2] **Pandey, K. B., & Rizvi, S. I.**, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2(5), 2009, 270–278.
- [3] **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.**, Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79(5), 2004, 727–747.
- [4] **Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., da Silva Campos, R. A., & Borguini, M. G.**, Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*, 2014.
- [5] **Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., & Djilas, S.**, Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, 2016, 81–109.
- [6] **Vinčić, M.**, Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2017.
- [7] **Kalt, W., Ryan, D., Duy, J., Prior, R., Ehlenfeldt, M., Vander Kloet, S.**, Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium section cyanococcus* spp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10), 2001.
- [8] **Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., Liu, H.**, Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions, *Separation and Purification Technology* 104, 2013, 17-25.
- [9] **Santos, P., Aguiar, A., Barbero, G., Rezente, C., Martinez, J.**, Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens L.*) assisted by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 22, 2015, 78-88.
- [10] **Vasiljević, N., Mičić, V., Perušić, M., Tomić, M., Panić, S., Kostić, D.**, Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of (poly)phenolic compounds from blueberry (*Vaccinium Myrtillus*) leaves using full-factorial design, *Ovidius Annals*, 2024.
- [11] \*\*\* International Organization for Standardization, ISO 14502-1:2005 Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent, 2005.
- [12] **Smolinski-Savi, P., Dos Santos, L., Goncalves, A., Biesek, S., Lima, C.**, Analysis of total flavonoids present in some of the most consumed conventional and organic fruits and vegetables in southern Brazil, *Demetra*, 2017, 275-288.
- [13] **Giusti, M., Wrolstad, R.**, Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, F1.2.1-F1.2.13.
- [14] **Vasiljević, N., Mičić, V., Kostić, D., Jovanović, Z., Lazić, D., Perušić, M., Tadić, G.**, Influence of process parameters on the extraction of phenolic compounds from black elderberry flowers (*Sambucus nigra L.*), VIII International Congress “Engineering, Environment and Materials in Process Industry“, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 2023, 205-215.