



Effect of cold plasma and ultrasound pretreatments on the chemical compositions and antioxidant properties of the hydroalcoholic extract of Quince leaves

Simin Tolouei¹, Bahram Fathi-Achachlouei^{2✉}, Rezvan Shaddel² and Jafar Borhanian³

¹MSc student. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

²Professor and ³Associate Professor respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

³Associate Professor, Department of physics, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

✉ Corresponding author: b_fathi@uma.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article history:
Received: October 15, 2023
Accepted: January 8, 2024
Published: May 19, 2024

Keywords:
Ultrasound, quince leaf, cold plasma, chemical and antioxidant compounds.

ABSTRACT

Background: Different parts of quince (fruit, seeds and leaves) have been used as traditional remedies for cardiovascular diseases, cough, bronchitis, nausea, fever, diarrhea, constipation, hemorrhoids, diabetes, and hypertension. However, the obtained results showed higher total concentrations of phenolics in quince leaves than in pulps, peels, and seeds. During the last few decades, many researches have been carried out to identify suitable methods for extraction with high efficiency and environmental friendliness. Moreover, nowadays, special attention has been paid to plants that are a rich source of natural antioxidants and bioactive properties, one of these plants is the quince leaves. Due to quince leaf extract is rich in phenolic and antioxidant compounds, it can be used as a natural antioxidant and be a good substitute for synthetic antioxidants.

Aims: In this research, the aim was to investigate the effect of cold plasma (CP) and ultrasound (US) pretreatments on the chemical compositions and antioxidant properties of the hydroalcoholic extract of the quince leaves.

Methods: In this research, the samples of the quince leaves were pretreated with CP and US. After extracting the leaves extracts and its concentration, the amount of total phenolic compounds, antioxidant activity, total chlorophyll, carotenoid, and color indices of the treated and control samples were investigated.

Results: The obtained results showed that both CP and US processes caused a significant increase ($P < 0.05$) in the amounts of phenolic and antioxidant compositions, total chlorophyll, and carotenoid. The color indices L^* , a^* , b^* decreased significantly ($P < 0.05$) compared to the control as a result of cold plasma pretreatment, but did not differ significantly compared to the control due to ultrasound pretreatment ($P > 0.05$).

Conclusion: Overall, based on this research's results, cold plasma pretreatment can be a better and more efficient method than ultrasound-assisted to extract bioactive compounds and replace conventional thermal methods.



Extended Abstract

Introduction: Quince (*Cydonia oblonga* Miller, *Cydonia maliformis* Miller, *Cydonia vulgaris* Pers., *Pyrus cydonia* L., Farsi name of “Beh”, Greek name of “Strythion”, and Azari name of “Heyva”) belongs to the Rosaceae family. It is typically grown in gardens with warm temperatures. The young branchlets of the quince tree are covered in a pale greyish wool, its leaves are elliptical, flowers can be pink or white, and the fruits are bright yellowish and usually pear-shaped. Various parts of the quince tree have been traditionally used for medicinal purposes, including treating cough, bronchitis, nausea, fever, diarrhea, cystitis, constipation, hemorrhoids, diabetes, and hypertension, as evidenced by a review of medical literature (Khoubnasabjafari and Jouyban, 2011). Several experimental or clinical studies have confirmed the effectiveness of this product. Despite the potential toxic effects associated with herbal medicines, there have been no significant reported side effects or contraindications linked to the consumption of quince products. Quince fruit is commonly consumed as food in the form of jam or jelly. Furthermore, other plants belonging to the Rosaceae family also exhibit beneficial biological activities (Khoubnasabjafari and Jouyban, 2011). Several studies have shown that quince tree is a good and low-cost natural source of phenolic acids and flavonoids, which are potent antioxidants. These compounds could provide a chemical basis to some health benefits claimed for quince leaf and fruit in folk medicine. It is well known that quince fruit shows antioxidant effects that result from the presence of several polyphenolic substances, e.g. flavonoids quercetin, rutin, kaempferol, etc, and also from increased levels of vitamin C. Different parts of quince (fruit, seeds and leaves) have been used as traditional remedies for cardiovascular diseases, cough, bronchitis, nausea, fever, diarrhea, constipation, hemorrhoids, diabetes, and hypertension. The total phenolic content of quince leaves varied from 4.9 to 16.5 g/kg dry matter. Moreover, organic acids composition of quince leaf was investigated; quinic acid (72.2%) and citric acid (13.6%) were the major acidic

components (Oliveira *et al.*, 2008). However, the obtained results showed higher total concentrations of phenolics in quince leaves than in pulps, peels, and seeds (Oliveira *et al.*, 2008). Costa *et al.* (2009) studied the methanolic extract from quince leaf and reported 5-Ocaffeoylquinic acid as the major phenolic compound. Antibacterial effects of aqueous and organic quince leaf extracts on gram-positive and gram-negative bacteria were also investigated. The obtained results indicated that ethanolic quince leaf extract had the greatest effect on gram-negative and gram-positive bacteria. Also, the aqueous extract showed the lowest effect on tested bacteria. Aqueous, ethanolic and acetic Quince leaf extracts not only had the inhibitory effect on the bacteria, but also had antibacterial properties. According to the results, Quince leaf extracts can be used against the bacterial infections of the study (Semnani *et al.*, 2017). Phenolic compounds play a crucial role in the prevention and treatment of various civilization diseases, such as colorectal cancer (CRC). In a recent study by Chojnacka *et al.* (2020), the phytochemical composition, antioxidant, and cytotoxic activities of crude phenolic extract (CPE) and purified phenolic-rich extracts (PRE) from Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) leaves were investigated and compared. The analysis revealed that both extracts contained a wide range of phenolic compounds (33-36 compounds in the PRE and CPE, respectively), with chlorogenic acid and naringenin hexoside identified as the major constituents. The antioxidant tests (FRAP and ABTS) demonstrated that PRE exhibited twice the antioxidant activity of CPE. Moreover, PRE showed higher cytotoxic activity against colon cancer cells (SW-480 and HT-29) compared to CPE. Following a 24-hour incubation period, the IC₅₀ value for SW-480 cell line was 239 µg/mL for PRE, while CPE required 72 hours to achieve a similar decrease at 277 µg/mL. Additionally, PRE displayed a more potent cytotoxic effect on colon cancer cell lines (SW-480 and HT-29) than on normal intestinal cells (CCD-18Co and CCD 841 CoN). These

findings provide initial evidence that Japanese quince leaf extracts, particularly the phenolic-rich extract (PRE), significantly reduce the viability of SW-480 and HT-29 cell lines, indicating potential cytotoxic activity against colon cancer cells (Chojnacka et al., 2020).

During the last few decades, many researches have been carried out to identify suitable methods for extraction with high efficiency and environmental friendliness. Cold plasma and ultrasound technologies has gained much interest from the food science and technology scientific community in the past 10 years. Since the first research on plasma and ultrasound application in food processing, this emerging technologies have shown great potential in the food industry. Moreover, nowadays, special attention has been paid to plants that are a rich source of natural antioxidants and bioactive properties, one of these plants is the quince leaves. Due to quince leaf extract is rich in phenolic and antioxidant compounds, it can be used as a natural antioxidant and be a good substitute for synthetic antioxidants. In this study, the main aim was to investigate the effect of cold plasma (CP) and ultrasound (US) pretreatments on the chemical compositions and antioxidant properties of the hydroalcoholic extract of the quince leaves.

Material and methods: To improve the performance of extraction at quince leaves, cold plasma (CP) pretreatment (5, 10, and 15 min) and ultrasound (US) (20 and 30 min) were used at different times, separately. Three samples of crushed quince leaves were subjected to CP pretreatment with a pressure of 500 mTorr, a voltage of 2.1 kV, and a current of 90 mA at different times of 5, 10, and 15 min. Also, three other samples of grounded leaves that were mixed with 80% ethanol were subjected to probed US pretreatment with a power of 300 W and a frequency of 24 kHz at different times of 10, 20, and 30 minutes. In this research, the samples of the quince leaves were pretreated with CP and US. After extracting the leaves extracts and its concentration, the amount of total phenolic compounds, antioxidant activity, total

chlorophyll, carotenoid, and color indices of the treated and control samples were investigated.

Results and discussion: The obtained results showed that both CP and US processes caused a significant increase ($P < 0.05$) in the amounts of phenolic and antioxidant compositions, total chlorophyll, and carotenoid. Non-thermal cold plasma as a novel method for maintaining safety and inducing phenolic accumulation in fresh-cut pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit and the possible mechanisms were investigated by Li et al. (2019). Findings indicated that subjecting the fruit to cold plasma treatment (60 kV for 5 min) led to a notable reduction in total aerobic bacterial counts, increased the cutting-induced phenolic accumulation, and an improvement in antioxidant activity in fresh-cut pitaya fruit. These results suggest that cold plasma treatment has the potential to be a valuable method for processing and preserving fresh-cut fruits and vegetables (Li et al. 2019). In agreement with this study, Bao et al. (2020a) reported the effect of CP treatment on improving the extraction of phenolic and antioxidant compounds from tomato pulp; their results showed that CP treatment increased the antioxidants of tomato pulp extract. The radicals generated by CP disintegrate the cellular tissue and plant cell walls which reduce the space barrier for molecules to transport and increase the release of free phenolics in the cell vacuole and cytoplasm into the solvent. Active plasma species have also the potential to break covalent bonds, thus releasing phenolic compounds that covalently bind to cell wall polysaccharides, which leads to higher extraction efficiencies. CP treatment also facilitates the extraction of free phenolic antioxidants in the solvent (Bao et al. 2020b). Several studies have been conducted regarding the effect of cold plasma treatment on antioxidant activity (Heredia and Cisneros-Zavalos 2009, Reyes and Cisneros-Zavalos 2003, Kang and Saltveit 2002, Reyes et al. 2007). The results observed in this study are similar to the results reported by Heredia and Cisneros-Zavalos (2009).

Ultrasonic-assisted extraction is one of the most inexpensive, rapid, simple and efficient techniques compared with conventional extraction. It has been applied to extract bioactive compounds from different materials owing to its high reproducibility at a shorter time, simplified manipulation, significant reduction in solvent consumption and temperature, and lower energy input (Liu *et al.*, 2013). In a recent study conducted by Fernandes *et al.* (2020), the effectiveness of ultrasound-assisted extraction in obtaining bioactive compounds from jaboticaba (a kind of dark berry) peel was evaluated. Specifically, the researchers focused on extracting the main anthocyanin, cyanidin-3-O-glucoside, and the main polyphenol, ellagic acid, from the peel of this dark berry. The study found that the application of ultrasound at a frequency of 25 kHz proved to be beneficial in extracting both compounds. Furthermore, the duration of the extraction process played a significant role in the yield of these bioactive compounds. A processing time of 20 minutes resulted in an increased yield of cyanidin-3-O-glucoside and ellagic acid. However, it is worth noting that prolonged processing time, exceeding 20 minutes, led to the hydrolysis of these compounds due to the sonochemical effects. The study also investigated the impact of pH on the extraction process. It was observed that the highest yield of bioactive compounds was achieved at 25 kHz, 20 min of extraction and pH1.5. Overall, the results highlights the effectiveness of ultrasound-assisted extraction in obtaining bioactive compounds from jaboticaba peel. The findings provide valuable insights for the development of extraction techniques that can be utilized in various applications, such as the pharmaceutical and food industries (Fernandes *et al.* 2020).

The obtained results showed that the amount of chlorophyll and carotenoids in the treatments using cold plasma and ultrasound had a significant increase compared to the control sample ($P < 0.05$). When exposed to plasma, carotenoids, like many other bioactive compounds, have the potential to either increase or decrease in concentration. The

specific mechanisms responsible for the fluctuations in carotenoid levels remain unclear. Research has indicated that glow discharge plasma can lead to an increase in carotenoid content at lower fluences, which are determined by the duration of exposure multiplied by the rate of plasma flow. Conversely, prolonged processing times have been associated with a decline in carotenoid levels (Fernandes and Rodrigues 2021).

Plasma treatment is recognized as a suitable technology to improve germination efficiency of numerous seeds. Effects of cold plasma treatment on wheat (Pishgam variety) yield were studied by Saberi *et al.* (2018). In this study, Seeds were pre-treated with 80 W of cold plasma at four levels of time, 60, 120, 180 and 240 seconds. The findings indicated that plasma treatments yielded favorable outcomes on wheat attributes, with the treatment lasting 180 seconds demonstrating the most pronounced stimulatory impact. Over the two years, cold plasma led to an increase in grain yield at 180 seconds, while a decrease was observed at 240 seconds in comparison to the control group. Carotenoid and anthocyanin levels were heightened at 180 seconds. Furthermore, starch content and grain protein levels were elevated with the application of cold plasma for 120 seconds compared to the control (Saberi *et al.* 2018).

The color indices L^* , a^* , b^* decreased significantly ($P < 0.05$) compared to the control as a result of cold plasma pretreatment, but did not differ significantly compared to the control due to ultrasound pretreatment. According to this study, Sanai *et al.* (1398) reported that the effect of cold plasma (gas type) on any of the *Curcuma longa* color indices was not significant, while with increasing plasma duration the mean of all color indices decreased. There were significant differences ($P < 0.05$) between 15 and 25 minutes.

Conclusion: Overall, based on this research's results, cold plasma pretreatment can be a better and more efficient method than ultrasound-assisted to extract bioactive compounds and replace conventional thermal methods. Also, this present study shows that

quince leaves are promising sources of valuable compounds and may be used to produce functional foods as well as for medical purposes.

تاثیر پیش تیمار پلاسمای سرد و اولتراسوند روی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی برگ به

سیمین طلوعی^۱، بهرام فتحی آچالویی^۲ ✉، رضوان شاددل^۲ و جعفر برهانیان^۳

^۱ کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۲ به ترتیب استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۳ دانشیار گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

✉ مسئول مکاتبه: b_fathi@uma.ac.ir

چکیده

مشخصات مقاله

زمینه مطالعاتی: قسمت‌های مختلف میوه به از قبیل خود میوه، دانه‌ها و برگ‌های آن به عنوان درمان سنتی برای بیماری‌های قلبی-عروقی، سرماخوردگی، برونشیت، تب و تهوع، اسهال، یبوست، هموروئید، دیابت و فشار خون استفاده شده است. در کل، غلظت ترکیبات فنولی در برگ‌های به بیشتر از پوست میوه، پالپ و دانه‌های آن می‌باشد. در طی چند دهه گذشته، تحقیقات بسیاری جهت شناسایی روش‌های مناسب برای استخراج با راندمان بالا و دوستدار محیط‌زیست، انجام شده است. همچنین امروزه توجه ویژه‌ای به گیاهانی که منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ویژگی‌های زیست‌فعال هستند شده است، که یکی از این گیاهان برگ به می‌باشد. از آنجا که عصاره برگ به غنی از ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی مورد استفاده قرار گیرد و جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد.

هدف: در این پژوهش، هدف بررسی تاثیر پلاسمای سرد و اولتراسوند روی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی برگ‌های میوه به می‌باشد.

روش کار: در این پژوهش نمونه‌های برگ به تحت پیش تیمار پلاسمای سرد و اولتراسوند قرار گرفتند و پس از استخراج عصاره برگ‌ها و تغلیظ آن، مقدار ترکیبات فنولی کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کلروفیل کل، کاروتنوئید و شاخص‌های رنگی نمونه‌های تیمار داده شده و نمونه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که هر دو فرآیند پلاسمای سرد و اولتراسوند باعث افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) در مقادیر ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی، کلروفیل کل و کاروتنوئید شدند. شاخص‌های رنگی L^* ، a^* ، b^* در اثر پیش تیمار پلاسمای سرد کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) نسبت به شاهد پیدا کردند، اما در اثر پیش تیمار اولتراسوند تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: در کل براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش پیش تیمار پلاسمای سرد نسبت به روش اولتراسوند روشی بهتر و کارآمدتر برای استخراج ترکیبات زیست فعال می‌تواند باشد.

نوع مقاله:

علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۲۳

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

انتشار: ۱۴۰۳/۲/۳۰

کلید واژه:

اولتراسوند، برگ به،

پلاسمای سرد، ترکیبات

شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

تحقیقات بسیاری جهت شناسایی روش‌های مناسب برای استخراج با راندمان بالا و دوستدار محیط زیست، در طی چند دهه گذشته، انجام شده است (گونزالز و همکاران ۲۰۱۵). در روش‌های متداول استخراج زمان استخراج طولانی‌تر بوده و به حلال گران قیمت و با خلوص بالا نیاز می‌باشد. همچنین تبخیر مقدار زیادی حلال و تجزیه حرارتی ترکیبات حساس به حرارت صورت گرفته و انتخاب پذیری استخراج کم می‌باشد (دی کاسترو و گارسیا ۱۹۹۸) برای غلبه بر محدودیت‌های روش‌های استخراج مرسوم، تکنیک‌های جدید و امیدوارکننده، برای استخراج معرفی شده‌اند که تکنیک‌های استخراج سبز نامیده می‌شوند. در این تکنیک‌ها سنتز شیمیایی کم خطرتر است و از حلال‌های کمکی ایمن، مواد اولیه تجدیدپذیر استفاده شده، مشتقات و تلفات ترکیبات غذایی و مصرف انرژی به حداقل رسیده و بررسی تاثیرات زمان، برای جلوگیری از آلودگی صورت می‌گیرد (سلواموتوکوماران و شی ۲۰۱۷).

فناوری پلاسما یکی از فناوری‌های سبز جدید است که امروزه در صنایع مختلف به ویژه صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (لوکو و همکاران ۲۰۰۴) پلاسما حالت چهارم ماده و گازی یونیزه است که شامل تعداد زیادی اجزای مختلف مانند الکترون‌ها، یون‌های مثبت و منفی، رادیکال‌های آزاد، اتم‌های گازی به همراه مولکول‌هایی در حالت پایه و برانگیخته به اضافه فوتون‌ها می‌باشد. از نظر دما، پلاسما به دو دسته پلاسما با دمای بالا (حرارتی) و پلاسما با دمای پایین (غیرحرارتی یا سرد) تقسیم می‌شود (افشاری و حسینی ۲۰۱۴، هر تویق و همکاران ۲۰۱۵، ژو و همکاران ۲۰۲۰). رادیکال‌های آزاد که توسط پلاسما ایجاد می‌شوند می‌توانند غشا و دیواره سلولی را تخریب کرده و باعث شوند که اجزای داخل سلول به داخل حلال آزاد شود (بوستا و نورویو ۲۰۱۴). بر اساس برخی مطالعات، پلاسما سرد می‌تواند در صنایع غذایی برای افزایش استخراج برخی از ترکیبات فنولی ملند

دیوسمتین^۱ در برگ‌های لوکوستا والرینلا^۲ (گرزگورزوسکی و همکاران ۲۰۱۱) و پلی فنول‌ها در آب زغال اخته استفاده شود (هو و همکاران ۲۰۱۹). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که میزان پلی فنول کل برگ چای سبز با استفاده از تیمار پلاسما سرد کمی افزایش یافته است (امینی و قرآن نویس ۲۰۱۶). با این حال، تخریب ترکیبات فنولی در برخی غذاها نیز مشاهده شده است (گرزگورزوسکی و همکاران ۲۰۱۱، پانکاج و همکاران ۲۰۱۷). این نتایج متفاوت می‌تولند به دلیل نوع منبع پلاسما، زمان و قدرت تیمار، گونه‌های فعال متنوع، نوع غذا و ماتریکس گیاهی باشد. بنابراین، استفاده از منبع پلاسما سرد که باعث کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش سرعت استخراج ترکیبات از گیاهان می‌شود برای برخی از صنایع مانند صنایع غذایی و دارویی بسیار ضروری و امیدوار کننده است (باو و همکاران ۲۰۲۰).

فناوری اولتراسوند یکی دیگر از فناوری‌های غیرحرارتی نوظهور می‌باشد. کاربرد روش اولتراسوند به عنوان یک روش آزمایشگاهی برای استخراج مواد گیاهی به طور گسترده بررسی شده است. مواد استخراج شده با این روش، شامل مواد موثره گیاهی، روغن، پروتئین و ترکیبات فعال زیستی از مواد گیاهی می‌باشند (ویناتورو ۲۰۰۱). فناوری اولتراسوند در مقایسه با فناوری‌های حرارتی مرسوم، می‌تواند باعث بهبود کیفیت غذا، افزایش ماندگاری، کاهش زمان فراوری و صرفه‌جویی در مصرف انرژی شود (چمات و خان ۲۰۱۱، لاگنیکا و همکاران ۲۰۱۳). همچنین استفاده از اولتراسوند می‌تولند باعث افزایش بازده و سرعت استخراج و کاهش دمای عملیاتی و استخراج ترکیبات حساس به حرارت شود که از فواید کاربرد اولتراسوند می‌باشند. امواج اولتراسوند، امواج صوتی با فرکانس‌های بالاتر از 20 کیلو هرتز هستند که نوسان‌های مکانیکی در یک ماده جامد، مایع و گاز ایجاد می‌کنند. تاثیرات مکانیکی اولتراسوند باعث نفوذ حلال بیشتر به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌بخشد، همچنین اولتراسوند می‌تواند در طی استخراج، دیواره‌های

² Valerianella locusta

¹ diosmetin

ترکیبات و عصاره آن‌ها برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی می‌تواند به کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل: برگ به در آون خشک و خرد شد که از باغات شهرستان شاهین‌دژ تهیه شده بود، اتانول ۹۶ درصد (لیان فیدارکیا- ایران)، متانول (شرکت مجلی- ایران)، استون خالص (شرکت مجلی- ایران)، معرف فولین سیوکالچو (مرک- آلمان)، اسید گالیک (مرک- آلمان)، کربنات سدیم (نوترون- ایران) و 2 و 2 دی فنیل-1-پیکریل هیدرازیل (مرک- آلمان).

جمع‌آوری و آماده‌سازی برگ به

برگ‌های درخت به اواخر شهریور ماه سال ۱۴۰۱ از باغات شهرستان شاهین‌دژ واقع در جنوب شرقی استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده و پس از شست‌وشو، ابتدا به مدت چند روز در سایه و سپس به مدت ۴۸ ساعت در آون 38°C خشک شدند. سپس با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی خرد شده و بعد از آن از الک آزمایشگاهی با مش ۱۸ عبور داده شدند.

تیماردهی با پلاسمای سرد

سه نمونه ۱۰۰ گرمی از برگ‌های به خرد شده که با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0.001 گرم وزن شده است، تحت تیمار پلاسمای سرد با فشار ۵۰۰ میلی‌تور، ولتاژ ۲.۱ کیلو ولت و جریان ۹۰ میلی‌آمپر در سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه قرار گرفتند.

تیماردهی با اولتراسوند

سه نمونه ۱۰۰ گرمی از برگ‌های به آسیاب شده که با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0.001 گرم وزن شده است، هر نمونه به نسبت ۶/۱ با اتانول ۸۰ درصد مخلوط شدند و سپس تحت تیمار اولتراسوند پروب با توان ۳۰۰ وات و فرکانس ۲۴ کیلوهرتز در سه زمان ۱۰، ۲۰، و ۳۰ دقیقه قرار گرفتند.

سلولی را تخریب و موجب تسهیل آزادسازی محتویات آن شود (کوماری و همکاران ۲۰۱۹). برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه شده و عصاره‌ی گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابد. مشخصات گیاهی مثل میزان رطوبت، اندازه‌ی ذرات و نوع حلال مورد استفاده، به منظور به دست آوردن استخراج کارآمد و موثر مهم هستند. به علاوه فاکتورهای زیادی شامل فرکانس، فشار، دما و زمان کارکرد امواج صوتی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (زونتار و همکاران ۲۰۱۹).

درخت به، از تیره گل‌سرخیان^۳ و زیر تیره اسپیرواید^۴ و تنها گونه جنس سیدونیا می‌باشد که با نام علمی سیدونیا اوبلانگا شناخته می‌شود. درخت به، بومی مناطقی از ایران، قفقاز و ترکمنستان می‌باشد که در ایران از آستارا تا کتول (استان گلستان) به صورت خودرو می‌روید (نعیمی و همکاران ۲۰۲۰). مواد شیمیایی مختلفی مثل اسیدهای آلی، پلی‌فنول‌ها، ترین‌ها، اسیدهای آمینه و گلیکوزیدها از بخش‌های مختلف گیاه مانند ریشه، ساقه، برگ، دانه، میوه و پوست جدا شده و شناسایی شده‌اند (روپ و همکاران ۲۰۱۱). مقدار کل ترکیبات فنولی در برگ‌های به بیشتر از سایر قسمت‌های گیاه است (الیویرا و همکاران ۲۰۰۸). عصاره برگ به، به خاطر داشتن ترکیبات فنولی از قبیل کوئرستین، کامپفرول، کافئویل کوبینک اسید و غیره می‌تواند برای بسیاری از بیماری‌ها مفید باشد. از برگ‌های به، می‌توان به عنوان یک منبع طبیعی و ارزان قیمت از ترکیبات زیست فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا استفاده کرد (واعظ و همکاران ۲۰۱۹). با عملی نمودن استفاده از برگ به در صنایع غذایی می‌توان علاوه بر رفع نیاز مصرف‌کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و بالابردن عمر نگهداری مواد غذایی و سطح ایمنی مواد غذایی، از هدر رفتن یک محصول جانبی جلوگیری نمود. از طرفی فناوری‌های ذکر شده، می‌تواند بازده استخراج ترکیبات زیست فعال را افزایش داده و بوسیله این فرآیندها بیشترین مقدار استخراج این

⁴ Spiraeoideae

³ Rosaceae

عصاره‌گیری و استخراج

پس از تیماردهی، همه نمونه‌ها برای عصاره‌گیری آماده شدند. برای عصاره‌گیری از نمونه‌های برگ به تیمار داده شده و یک نمونه شاهد، از حلال هیدروالکلی با اتانول ۸۰ درصد استفاده شد. عصاره‌گیری از نمونه‌ها با استفاده از شیکر آزمایشگاهی ساده با دور ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق (25 ± 2 درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد.

سپس محلول با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد و با استفاده از دستگاه سانتریفوژ مواد جامد احتمالی باقی‌مانده ته‌نشین شدند. سپس با استفاده از دستگاه روتاری تحت خلاء در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه تا ۱/۳ مقدار اولیه تغلیظ شد. محلول نهایی در پلیت‌های شیشه‌ای ریخته شده و سپس توسط آون در ۳۸ درجه سانتی‌گراد خشک شد. نمونه‌ها تا رسیدن به وزن ثابت به دسیکاتور منتقل شدند. عصاره‌های خشک شده تا موقع انجام آزمایشات با فویل‌های آلومینیومی پوشانده شده و در یخچال نگهداری شدند.

تعیین مقدار ترکیبات فنولی کل

ترسیم منحنی کالیبراسیون

در ابتدا محلول‌های استاندارد اسیدگالیک با رقت‌های ۰ تا ۲۰۰ قسمت در میلیون (PPM) تهیه شدند. ۰/۵ میلی لیتر از محلول‌های تهیه شده به لوله‌ی آزمایش انتقال داده شد و بعد ۰/۲ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد فولین سیوکالچو به آن‌ها اضافه گردید و سپس به خوبی مخلوط شدند. سپس ۲ میلی لیتر محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم به مخلوط تهیه شده اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق داخل لوله‌های فویل پیچی شده نگهداری شدند و سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (شهیدی و ناکزک ۲۰۰۳). منحنی کالیبراسیون نقطه‌ای غلظت اسیدگالیک در برابر میزان جذب مطابق شکل ۱ رسم گردید. معادله بدست آمده با ضریب تبیین 0.9962 به صورت $y = 0.0078x - 0.0424$ بدست آمد که y میزان جذب خوانده شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر و x مقدار ترکیبات پلی فنولی

کل بر حسب میلی گرم معادل اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم عصاره بود.

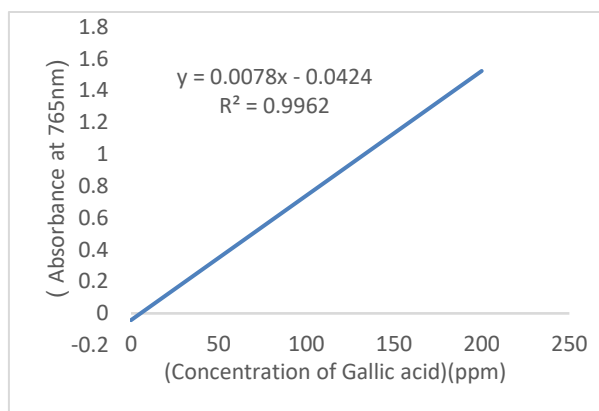


Figure 1- Concentration of Gallic acid calibration curve vs absorbance at wavelength 765nm

۰/۵ میلی لیتر از عصاره برگ به که با رقت ۲۰۰ PPM تهیه شد با ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱۰٪ فولین سیوکالچو مخلوط شده و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه، داخل لوله‌های فویل پیچی شده در محیطی تاریک، نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده گردید (کوساه و همکاران ۲۰۱۱). محلول فولین سیوکالچو به صورت روزانه تهیه شد. مقدار ترکیبات فنولی بر حسب میلی گرم معادل اسیدگالیک موجود در ۱۰۰ گرم برگ به طبق معادله بالا محاسبه گردید.

اندازه گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد. روش DPPH طبق پروتکل گزارش شده توسط انجم و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. ابتدا ۴ میلی گرم DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول حل شد. سپس نمونه استخراج شده در غلظت ۲۰۰ PPM (حلال متانول) و محلول DPPH تهیه شده به نسبت ۱/۹ مخلوط شدند و مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس جذب مخلوط واکنش با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. به عنوان استاندارد از عصاره متانولی محلول DPPH استفاده شد. سپس فعالیت مهارکنندگی

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز آماری در این تحقیق از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. اطلاعات بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس، تحلیل شده و برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه‌ها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده گردید، برای این منظور نرم افزار آماری SAS به کار برده شد.

نتایج و بحث

مقدار ترکیبات فنولی کل

در این مطالعه، مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های برگ به، برحسب میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در گرم عصاره به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالچو محاسبه گردید. طبق جدول ۱ مشاهده می‌شود که مقدار ترکیبات فنولی کل در نمونه‌های تیمار دیده نسبت به نمونه‌ی شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافتند ($P < 0.05$). از طرفی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی کل در بین نمونه‌های تیمار پلاسما، مربوط به تیمارهای ۱۰ دقیقه بود که با تیمارهای ۵ و ۱۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری داشتند. بنابراین، جهت استخراج ترکیبات فنولی و برای صرفه‌جویی در زمان و انرژی تیمار ۱۰ دقیقه پلاسما می‌تواند تیمار بهینه باشد. پلاسما سرد بعنوان یک تکنیک نوین سبز منجر به افزایش راندمان استخراج ترکیبات زیستی از قبیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و پلی‌فنولی می‌شود. مکانیسم اثر پلاسما سرد بدین صورت می‌باشد که این تکنیک با تخریب غشای سلول‌ها و دیواره سلولی در گیاهان در اثر ایجاد گونه‌های فعال شیمیایی، رادیکال‌های آزاد، یون‌ها، الکترون‌ها، اتم‌های گازی به همراه مولکول‌هایی در حالت پایه و برانگیخته به اضافه فوتون‌ها منجر به تسهیل خروج ترکیبات داخل سلولی و انتقال آن به حلال استخراجی می‌شود (بوستا و نورویو ۲۰۱۴). نتایج تحقیقات لی و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داد که تیماردهی پلاسما سرد روی میوه پیتایا (Pitaya) منجر به افزایش ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی میوه شد. همچنین مطالعه‌ای جهت بررسی استخراج ترکیبات فنولی از تفاله انگور

رادیکال به عنوان درصد نرخ تغییر رنگ DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد =

$$(1 - \text{Ac}/\text{As}) \times 100$$

AC: جذب مخلوط محلول عصاره و محلول DPPH

AS: جذب محلول DPPH (استاندارد)

اندازه گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید کل

۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به یک گرم نمونه‌ی عصاره‌ی خشک شده اضافه شد و مخلوط هموژن از آن تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از مخلوط هموژن با ۹ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه با ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فازهای رویی برای اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید کل جدا شدند. برای سنجش کلروفیل a، b و کاروتنوئید عصاره برگ به، جذب آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. نهایتاً مقادیر با استفاده از معادلات زیر به دست آمد (لیچنتنالر و بوسچمن ۲۰۰۱).

$$\text{Chl a} = (12.25 \times A_{663} - 2.79 \times A_{646})$$

$$\text{Chl b} = (21.21 \times A_{646} - 5.1 \times A_{663})$$

$$\text{Chl total} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$\text{Carotenoid} = (1000 \times A_{470} - 1.82 \times \text{chl a} - 85.02 \times \text{chl b}) \div 198$$

آزمون رنگ سنجی

آزمون رنگ سنجی با استفاده از دستگاه رنگ سنج (konica Minolta مدل CR400) انجام گرفت. تغییرات رنگ نمونه‌های عصاره‌ی شاهد و تیمار شده به روش پلاسما، اولتراسوند و مایکروویو با استفاده از اندازه‌گیری شاخص *L* (سیاه-سفید) و شاخص‌های *a* (قرمز-سبز) و *b* (آبی-زرد) به طور جداگانه مشخص شد (آدیل و همکاران ۲۰۱۳). بر این اساس کل نمونه‌های عصاره‌های خشک شده بر روی سطح سفیدی قرار داده شد، سپس دستگاه بر ۵ نقطه مختلف از نمونه قرار گرفت و پارامترهای رنگی تعیین شدند.

آمده توسط رودریگز و همکاران (۲۰۰۸) و بالاچاندان و همکاران (۲۰۰۶) و داپورتو و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت. همچنین طبق جدول ۱ مشاهده شد که بهترین زمان برای استخراج ترکیبات فنلی ۳۰ دقیقه است. در زمان‌های بیشتر از ۳۰ دقیقه، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کم خواهد شد و به این دلیل که در ۳۰ دقیقه، همه ترکیبات فنلی استخراج خواهند شد و با افزایش زمان، ترکیبات فنلی، بیشتر تحت تاثیر دما و امواج فراصوت و فشار حباب‌های کائیتاسیونی قرار خواهند گرفت (لیو و همکاران ۲۰۱۳). در نتیجه اکسیداسیون صورت گرفته و باعث تخریب و کاهش مقدار ترکیبات فنولی خواهد شد.

Table1. Total phenolic compounds content (mg gallic acid/100g extract) of hydroalcoholic extracts of treated and control quince leaves

Treatment*	Total phenolic content (mg gallic acid/100g extract)
Control	93.469 ± 0.32 ^{g*}
Plasma 5 min	103.555 ± 0.41 ^c
Plasma 10 min	116.415 ± 0.74 ^a
Plasma 15 min	99.367 ± 0.07 ^f
Ultrasound 10 min	100.179 ± 0.38 ^e
Ultrasound 20 min	101.333 ± 0.12 ^d
Ultrasound 30 min	106.809 ± 0.19 ^b

*Mean ± Standard deviation

Different lowercases within a column indicate significant differences (p<0.05) among treatments.

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از این آنالیز بر طبق جدول ۲ نشان داد که درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمامی تیمارها (تیمارهای پلاسما و اولتراسوند) نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). تاثیر پلاسما روی ترکیبات فنولی همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین تیمارهای ۱۰ و ۱۵ دقیقه پلاسما با تیمار ۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵)، اما بین دو تیماردهی پلاسما سرد با زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه‌ای تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. افزایش درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط پیش‌تیمارهای فوق توسط مطالعات قبلی نیز گزارش شده است. کیم و همکاران در سال

توسط پلاسما سرد اتمسفری با ولتاژ بالا در ۳ زمان (۱۵، ۱۰، ۵ دقیقه) صورت گرفت که نتایج بدست آمده از هر دو تیمار ۵ و ۱۵ دقیقه‌ای بازده استخراج فنولی بالایی را در مقایسه با شاهد نشان دادند و تیمار ۱۰ دقیقه‌ای میانگین بالاتری را نشان داد (باو و همکاران ۲۰۲۰). همچنین طبق جدول ۱ در بین نمونه‌های تیمار داده شده با اولتراسوند در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد مقدار ترکیبات فنولی کل در نمونه‌های تیمار دیده نسبت به نمونه‌ی شاهد افزایش یافت. مطابق مطالعه‌ای که جهت بررسی اثر عصاره‌گیری از پوست انار به کمک پروب فراصوت بر ترکیبات صورت گرفت نشان داده شد که شیوه اعمال اولتراسوند، نوع حلال مصرفی و مدت زمان فراصوت‌دهی بر ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنتی‌رادیکالی موثر می‌باشد و با افزایش مدت زمان اولتراسوند، استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌رادیکالی افزایش می‌یابد (شهرکی و همکاران ۲۰۱۶). که با نتایج پژوهش حاضر در تطابق است. همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط فرناندز و همکاران (۲۰۲۰) که به بررسی استخراج ترکیبات فنولی از پوست نوعی توت پرداختند. نتایج آن‌ها نیز افزایش بازده استخراج را بعد از تیمار با اولتراسوند نشان داد. جاکوز و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که در استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌های *Ilex paraguariensis* روش استخراج غرقابی به کمک امواج فراصوتی موثرتر از روش غرقابی بدون امواج فراصوت است. امواج فراصوت می‌توانند از طریق تولید حباب‌هایی در مایع فشار منفی در محیط ایجاد کنند. حباب‌های ایجاد شده، رشد کرده سپس تخریب می‌شوند. فروپاشی حباب‌ها نزدیک لایه‌ی مرزی فاز جامد، به صورت نامتقارن می‌باشد که باعث ایجاد جریان با سرعت زیاد در مایع می‌شود. این فوران درون محیط ضربه‌های قوی به سطح فاز جامد وارد می‌کند (لوکیو گارسیا و دی کاسترو ۲۰۰۳). بنابراین تغییر ایجاد شده در محیط باعث افزایش سرعت استخراج می‌شود. گابالدون-لیوا و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که امواج فراصوت، به دلیل افزایش نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی، انتقال جرم برخی از ترکیبات فلفل قرمز را افزایش می‌دهند. نتایج تحقیق حاضر با نتایج به دست

اندازه گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید

نتایج این آنالیز براساس جدول 3 نشان داد که مقدار کلروفیل a در تیمارهای پلاسما سرد و اولتراسوند افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد داشت ($P < 0.05$) در بین تیمارهای پلاسما سرد نیز اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده شد به طوری که با افزایش زمان تیماردهی مقدار کلروفیل a نیز افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین بین تیمارهای اولتراسوند نیز اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده شد و با افزایش زمان تیماردهی مقدار کلروفیل a نیز افزایش یافت. در مقادیر کلروفیل b در تیمارهای پلاسما سرد و اولتراسوند نسبت به نمونه شاهد روند افزایشی مشاهده شد. بین خود تیمارها در پلاسما سرد و اولتراسوند نیز افزایش معنی‌داری گزارش شد ($P < 0.05$). مقادیر کاروتنوئید کل در تیمارهای پلاسما سرد افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت و با افزایش زمان تیماردهی مقدار کاروتنوئید نیز افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$). به طوری که بیشترین مقدار کاروتنوئید مربوط به تیمار 15 دقیقه می‌باشد. مقدار کاروتنوئید در تیمار اولتراسوند نیز افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد داشت ($P < 0.05$). و با افزایش زمان تیماردهی مقدار کاروتنوئید کل نیز افزایش یافت. کاروتنوئیدها می‌توانند در اثر تیمار پلاسما افزایش یا کاهش پیدا کنند. مکانیسم افزایش و کاهش کاروتنوئید هنوز ناشناخته است. نشان داده شد که پلاسما سرد محتویات کاروتنوئیدها را در جریان های کم افزایش می‌دهد. با این حال، کاهش کاروتنوئیدها در زمان پردازش طولانی رخ می‌دهد (فرناندز و رودریگز ۲۰۲۱). در مطالعه‌ای که کیفیت گندم تحت تیمار پلاسما بررسی شده بود نشان داده شد که اثر تیمار پلاسما بر میزان کلروفیل در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$) و باعث افزایش مقدار کلروفیل شد. همچنین نشان داده شد که پلاسما سرد به طور قابل توجهی کاروتنوئید را نسبت به شاهد افزایش داد (همکاران ۲۰۱۸). همچنین در مطالعه‌ای که با هدف بررسی اثرات پلاسما سرد اتمسفری تخلیه سد دی‌الکترونیک بر عملکرد ریحان انجام شد نشان داده شد که کلروفیل a به طور قابل توجهی تحت تأثیر کاربرد پلاسما قرار گرفت و میزان کلروفیل a تا مدت زمان

۲۰۱۷ بودر پیاز را تحت تیمار پلاسما میکروویو قرار دادند. نشان داده شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده با روش DPPH افزایش یافت. این مطالعات نشان می‌دهند که نوع محصول غذایی، منبع تولید پلاسما، حالت مواجه پلاسما (مستقیم یا غیرمستقیم) با ماده موردنظر، در کنترل اثرات پلاسما سرد روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصولات غذایی حیاتی هستند (پانکجا و همکاران ۲۰۱۸). مطالعات متعددی در رابطه با تأثیر تیمار پلاسما سرد بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شده است (هردیا و سیسنروس-زوالوس ۲۰۰۹، ریس و سیسنروس-زوالوس ۲۰۰۳، کانگ و سالت ویت ۲۰۰۲، ریس و همکاران ۲۰۰۷). نتایج مشاهده شده در این مطالعه مشابه نتایج گزارش شده توسط هردیا و سیسنروس-زوالوس (۲۰۰۹) است. افزایش اولیه فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به فعالیت اکسیدازها و هم به غلظت پلی‌فنل‌ها نسبت داد (ساکچتی و همکاران ۲۰۰۸) همچنین نتایج حاصل از این آنالیز بر طبق جدول ۲ نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمامی نمونه‌های تیمار دیده توسط اولتراسوند نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$) که نشان می‌دهد در غلظت‌های یکسان حلال و قدرت یکسان امواج اولتراسوند با افزایش زمان اولتراسوند درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج پژوهش‌های دلمارکونتراس و همکاران (۲۰۲۰) وانگ و همکاران (۲۰۱۸) شیرزاد و همکاران (۲۰۱۷) که بیان داشتند استفاده از امواج فراصوت منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد در تطابق بود.

Table 2. Percentage of antioxidant activity of hydroalcoholic extracts at treated and control quince leaves

Treatment*	Antioxidant activity (%)
Control	86.442 ± 0.34 ^{fe}
Plasma 5 min	89.039 ± 0.19 ^d
Plasma 10 min	90.417 ± 0.38 ^a
Plasma 15 min	90.673 ± 0.28 ^a
Ultrasound 10 min	89.071 ± 0.05 ^e
Ultrasound 20 min	89.487 ± 0.24 ^c
Ultrasound 30 min	89.968 ± 0.29 ^b

*Mean ± Standard deviation

Different lowercases within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

ارزیابی شاخص‌های رنگی

نتیجه تغییر رنگ نمونه‌های تیمار داده شده برای هر سه شاخص رنگ، *L (میزان روشنایی)، *a (سبزی - قرمزی)، *b (آبی - زردی) جداگانه مورد بحث قرار گرفته است. اندازه‌گیری شاخص‌ها در ۵ قسمت متقارن صورت گرفت و مقدار میانگین آن‌ها گزارش شد. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود نمونه‌های تیمار داده شده با پلاسما سرد در شاخص *L، کاهش پیدا کرده و تفاوت معنی‌داری با شاهد دارند ($P < 0/05$) ولی نمونه‌های تیمار داده شده با پلاسما سرد در زمان‌های مختلف، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$). همچنین نمونه‌های تیمار داده شده با اولتراسوند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد نداشتند. در مورد شاخص *a نمونه‌های تیمار داده شده با پلاسما سرد نسبت به نمونه‌ی شاهد به صورت معنی‌داری کاهش یافتند ($P < 0/05$) به این معنی که از شدت رنگ قرمز کاسته شد. ولی نمونه‌های تیمار داده شده با پلاسما سرد در زمان‌های مختلف، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$). شاخص *b با اعمال تیمار پلاسما سرد در هر ۳ زمان تیماردهی کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد نداشتند ($P < 0/05$) و با اعمال تیمار اولتراسوند اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد مشاهده نشد. این نتایج با نتایج حاصل از بررسی فریده سنایی و همکاران (۱۳۹۸) که بیان داشتند با اعمال پیش تیمار پلاسما سرد میانگین هر سه شاخص رنگی (*L, *a, *b) در زردچوبه کاهش یافت مطابقت دارد. همچنین لی و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی اثر پلاسما بر رنگ نمونه‌های برنج قهوه‌ای به این نتیجه رسیدند که مقادیر شاخص‌های *a, *b در نمونه‌های تیمار داده شده کمتر از نمونه شاهد بود. همچنین با نتایج حاصل از بررسی تاثیر پلاسما سرد بر آرد گندم که نشان داد تیمار پلاسما شاخص‌های *a, *b را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و پایین‌ترین مقادیر مربوط به پلاسما ۱۰ دقیقه بود، مطابقت داشت (توکلی و همکاران ۲۰۲۲). پارک‌جی سوک و ها جی دبلیو (۲۰۱۹) که به بررسی اثر تیمار اولتراسوند همراه با اسید فوماریک بر روی آب سیب پرداختند متوجه شدند که مقادیر شاخص‌های *L، *a، *b آب سیب تیمار داده شده

۲۰ دقیقه به حداکثر مقدار خود رسید و بعد از آن کاهش یافت. برهمکنش بین پلاسما و زمان تابش به طور قابل توجهی بر مقدار کلروفیل b نیز تأثیر گذاشت نتایج نشان داد که حداکثر مقدار کلروفیل b پس از اعمال پلاسما به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه به دست آمد. همچنین نشان داده شد که حداکثر و حداقل مقدار کلروفیل کل پس از اعمال پلاسما به مدت ۲۰ و ۳۰ دقیقه بود و پس از تیمار بذرها با پیش تیمار پلاسما سرد به مدت ۲۰ دقیقه، حداکثر مقدار کاروتنوئید حاصل شد (ابرقویی و همکاران ۲۰۲۱). رحیمی و همکاران (۲۰۱۷) اثر اولتراسوند بر مقدار کلروفیل a استخراج شده از *Chlorella microalgae* را بررسی کردند، نتایج نشان داد که استخراج کلروفیل a از طریق قرار گرفتن مستقیم در معرض امواج فراصوت با فرکانس بالا به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافته است. اثر اولتراسوند بر مقدار کلروفیل b استخراج شده نیز نشان داد که مقدار کلروفیل b استخراج شده از *Chlorella sp.* هنگامی که تحت تیمار اولتراسوند فرکانس بالا قرار گرفت، افزایش یافت. قرار گرفتن در معرض مستقیم اولتراسوند باعث شد که فرآیند استخراج در مقایسه با شاهد به طور قابل توجهی بهبود یابد ($P < 0/05$). اثرات اولتراسوند بر کلروفیل کل استخراج شده از *Chlorella sp.* در سیستم مستقیم باعث افزایش قابل توجهی در بازده کل کلروفیل شد. همچنین تفاوت معنی‌داری ($P < 0/05$) بین سیستم اولتراسوند مستقیم و شاهد مشاهده شد. همچنین طبق پژوهش‌های صورت گرفته توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۷) و با بررسی منحنی‌های آرایه شده برای کارتنوئید، این نتایج به دست آمد که تابش امواج اولتراسوند به طور قابل توجهی بازده استخراج کارتنوئید را تا زمان ۳۰ دقیقه نسبت به شاهد افزایش داد و بعد از آن با افزایش زمان مقدار کارتنوئید کاهش یافت. زیرا با افزایش زمان اولتراسوند، پدیده کاویتاسیون ممکن است باعث تسریع یا تحریک واکنش‌های شیمیایی در محیط استخراج شود. بنابراین، منجر به تخریب کارتنوئید به دلیل ساختار پلی‌ایزوپرنوئیدی آن شود که از یک زنجیره بلند مزدوج از پیوندهای دوگانه کربن-کربن تشکیل شده است (سان و همکاران ۲۰۱۰).

شاخص‌های رنگی L^* , a^* , b^* در اثر پیش تیمار پلاسمای سرد کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد پیدا کردند، اما در اثر پیش تیمارهای اولتراسوند تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند ($P > 0.05$). براساس نتایج این پژوهش پیش تیمارهای پلاسمای سرد و اولتراسوند در برگ به می‌تواند باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی شوند و برگ به در روغن‌ها با هدف کاهش اکسیداسیون استفاده گردد. با استفاده از برگ به در صنعت غذا، می‌توان به طور همزمان تقاضای مصرف‌کنندگان برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را برآورد کرده و سطح ایمنی مواد غذایی را افزایش داد. این موضوع می‌تواند بهبود کیفیت محصولات غذایی و اعتماد مصرف‌کنندگان را به صنعت غذا بیشتر کند. بر اساس نتایج یافت‌شده تیمار پلاسمای سرد به صورت موثرتری در این پژوهش عمل کرده و به نظر می‌رسد بتواند انتخاب بهتری برای معرفی به صنعت باشد.

تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با مقادیر رنگی نمونه شاهد نداشتند.

نتیجه‌گیری

برگ‌های به یک منبع طبیعی غنی از ترکیبات فعال‌زیستی هستند. علاوه بر این، برگ‌ها ارزان بوده و پس از برداشت میوه به طور گسترده در دسترس هستند. عصاره برگ به دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه و مقادیر غنی از ترکیبات فنولی است که می‌تواند در صنایع غذایی و داروسازی به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان و نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده شود. نتایج نشان داد که هر دو فرآیند پلاسمای سرد و اولتراسوند باعث افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقادیر ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی و کاروتنوئید شدند. همچنین پلاسمای سرد و اولتراسوند باعث افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقدار کلروفیل کل شدند.

Table 3. chlorophyll a, b, total chlorophyll, and carotenoid contents of hydroalcoholic extracts of the treated and control quince leaves

Treatment*	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoids
Control	3.436 ± 0.02 ^{g*}	1.436 ± 0.02 ^g	4.798 ± 0.05 ^g	3.299 ± 0.005 ^g
Plasma 5 min	7.834 ± 0.02 ^c	3.320 ± 0.02 ^c	11.154 ± 0.06 ^c	5.946 ± 0.03 ^c
Plasma 10 min	20.889 ± 0.08 ^b	11.906 ± 0.02 ^a	32.795 ± 0.16 ^b	8.721 ± 0.03 ^b
Plasma 15 min	23.272 ± 0.04 ^a	11.508 ± 0.02 ^b	34.780 ± 0.17 ^a	9.693 ± 0.13 ^a
Ultrasound 10 min	5.517 ± 0.03 ^f	1.685 ± 0.02 ^f	7.202 ± 0.05 ^f	3.619 ± 0.05 ^f
Ultrasound 20 min	5.744 ± 0.04 ^e	1.864 ± 0.02 ^e	7.609 ± 0.03 ^e	4.430 ± 0.02 ^e
Ultrasound 30 min	7.468 ± 0.02 ^d	2.283 ± 0.02 ^d	9.751 ± 0.05 ^d	4.701 ± 0.05 ^d

*Mean ± Standard deviation

Different lowercases within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

Table 4. color indices contents of hydroalcoholic extracts of the treated and control quince leaves

Treatment*	L*	a*	b*
Control	5.43 ^{ab*} ± 36.727	15.117 ± 1.65 ^a	24.834 ± 9.95 ^{abc}
Plasma 5 min	0.01 ^c ± 24.100	-0.073 ± 0.04 ^c	0.437 ± 0.03 ^d
Plasma 10 min	24.120 ± 0.01 ^c	-0.110 ± 0.05 ^c	0.417 ± 0.02 ^d
Plasma 15 min	24.120 ± 0.03 ^c	-0.077 ± 0.05 ^c	0.430 ± 0.02 ^d
Ultrasound 10 min	31.490 ± 2.72 ^b	12.067 ± 1.50 ^{ab}	13.030 ± 3.45 ^c
Ultrasound 20 min	34.553 ± 4.28 ^{ab}	13.590 ± 1.42 ^a	16.367 ± 6.05 ^{bc}
Ultrasound 30 min	38.893 ± 8.40 ^a	14.448 ± 1.70 ^a	25.790 ± 15.11 ^{ab}

*Mean ± Standard deviation

Different lowercases within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

References

- Aadil RM, Zeng XA, Han Z, Sun DW. 2013. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food chemistry* 141(3):3201-6.
- Abarghuei FM, Etemadi M, Ramezani A, Esehaghbeygi A, Alizargar J. 2021. An application of cold atmospheric plasma to enhance physiological and biochemical traits of Basil. *Plants* 10(10):2088.
- Afshari R, Hosseini H. 2014. Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. *Archives of Advances in Biosciences* 5(1).
- Amini M, Ghoranneviss M. 2016. Black and green tea decontamination by cold plasma. *Research Journal of Microbiology* 11(1):42.
- Anjum S, Abbasi BH, Hano C. 2017. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 129:73-87.
- Bao Y, Reddivari L, Huang J-Y (2020a) Development of cold plasma pretreatment for improving phenolics extractability from tomato pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 65:102445.
- Bao Y, Reddivari L, Huang JY. (2020b) . Enhancement of phenolic compounds extraction from grape pomace by high voltage atmospheric cold plasma. *LWT-Food Science and Technology* 133:109970.
- Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M. 2006. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics sonochemistry* 13(6):471-9.
- Boussetta N, Vorobiev E. 2014. Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie* 17(3):197-203.
- Chemat F, Khan MK. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry* 18(4):813-35.
- Chojnacka K, Sosnowska D, Polka D, Owczarek K, Górlach-Lira K, Oliveira De Verasa B. and Lewandowska U. 2020. Comparison of phenolic compounds, antioxidant and cytotoxic activity of extracts prepared from Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) leaves. *Journal of Physiology and Pharmacology* 71(2).
- Costa RM, Magalhães AS, Pereira JA, Andrade PB, Valentão P, Carvalho M, Silva BM. 2009. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical toxicology*. 47(4):860-5.
- Da Porto C, Porretto E, Decorti D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry* 20(4):1076-80.
- De Castro ML, Garcia-Ayuso LE. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*: 369(1-2):1-0.
- Del Mar Contreras M, Lama-Muñoz A, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. 2020. Valorization of olive mill leaves through ultrasound-assisted extraction. *Food chemistry* 314:126218.
- Fernandes FA, Fonteles TV, Rodrigues S, de Brito ES, Tiwari BK. 2020. Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolics from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: kinetics and mathematical modeling. *Journal of food science and technology* 57:2321-8.
- Fernandes FA, Rodrigues S. 2021. Cold plasma processing on fruits and fruit juices: A review on the effects of plasma on nutritional quality. *Processes* 9(12):2098.
- Gabaldón-Leyva CA, Quintero-Ramos A, Barnard J, Balandrán-Quintana RR, Talamás-Abbud R, Jiménez-Castro J. 2007. Effect of ultrasound on the mass transfer and physical changes in brine bell pepper at different temperatures. *Journal of Food Engineering* 81(2):374-9.
- González-Centeno MR, Comas-Serra F, Femenia A, Rosselló C, Simal S. 2015. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics sonochemistry* 22:506-14.
- Grzegorzewski F, Ehlbeck J, Schlüter O, Kroh LW, Rohn S. 2011. Treating lamb's lettuce with a cold plasma—Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. *LWT-Food Science and Technology* 44(10):2285-9.

- Heredia JB, Cisneros-Zevallos L. 2009. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. *Postharvest Biology and Technology* 51(2):242-9.
- Hertwig C, Reineke K, Ehlbeck J, Knorr D, Schlüter O. 2015. Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control* 55:221-9.
- Hou Y, Wang R, Gan Z, Shao T, Zhang X, He M, Sun A. 2019. Effect of cold plasma on blueberry juice quality. *Food chemistry* 290:79-86.
- Jacques RA, dos Santos Freitas L, Pérez VF, Dariva C, de Oliveira AP, de Oliveira JV, Caramao EB. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics sonochemistry*. 14(1):6-12.
- Kang HM, Saltveit ME. 2002. Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(26):7536-41.
- Khoubnasabjafari M, and Jouyban A. 2011. A review of phytochemistry and bioactivity of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Journal of Medicinal Plants Research* 5(16): 3577-3594.
- Kim JE, Oh YJ, Won MY, Lee KS, Min SC. 2017. Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments. *Food Microbiology* 62:112-23.
- Kumari B, Tiwari BK, Walsh D, Griffin TP, Islam N, Lyng JG, Brunton NP, Rai DK. 2019. Impact of pulsed electric field pre-treatment on nutritional and polyphenolic contents and bioactivities of light and dark brewer's spent grains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 54:200-10.
- Kossah R, Zhang H, Chen W. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control* 22(1):128-32.
- Lagnika C, Zhang M, Mothibe KJ. 2013. Effects of ultrasound and high pressure argon on physico-chemical properties of white mushrooms (*Agaricus bisporus*) during postharvest storage. *Postharvest biology and technology* 82:87-94.
- Lee KH, Kim HJ, Woo KS, Jo C, Kim JK, Kim SH, Park HY, Oh SK, Kim WH. 2016. Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice. *Lwt*. 73:442-7.
- Lewko J, Scibisz K, Sadowski A. 2004. Mineral element content in the leaves of rootstocks used for pears and of maiden trees budded on them. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*;3(2).
- Li X, Li M, Ji N, Jin P, Zhang J, Zheng Y, Zhang X, Li F. 2019. Cold plasma treatment induces phenolic accumulation and Cold plasma treatment induces phenolic accumulation and enhances antioxidant activity in fresh-cut pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit. *Lwt*, 115: 108447.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* 1(1):F4-3.
- Liu Y, Wei S, Liao M. 2013. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Industrial Crops and products* 49:837-43.
- Luque-Garcia JL, De Castro ML. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22(1):41-7.
- Naeimi K, Abdollahi H, Miri M. 2020 Evaluation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) seedlings originated from North West of Iran and preliminary selection of promising genotypes. *Iranian Journal of Horticultural Science* 50(4): 967-981.
- Oliveira AP, Pereira JA, Andrade PB, Valentão P, Seabra RM, Silva BM. 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food chemistry* 111(2):393-9.
- Pankaj SK, Wan Z, Colonna W, Keener KM. 2017. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(12):4016-21.
- Pankaj SK, Wan Z, Keener KM. 2018. Effects of cold plasma on food quality: A review. *Foods* 7(1):4.
- Park JS, Ha JW. 2019. Ultrasound treatment combined with fumaric acid for inactivating food-borne pathogens in apple juice and its mechanisms. *Food microbiology* 84:103277.

- Rahimi M, Mohamadian E, Dadari S, Arbab MM, Karimi N. 2017. Application of high frequency ultrasound in different irradiation systems for photosynthesis pigment extraction from *Chlorella* microalgae. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 34:1100-8.
- Reyes LF, Cisneros-Zevallos L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18):5296-300.
- Reyes LF, Villarreal JE, Cisneros-Zevallos L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry* 101(3):1254-62.
- Rodrigues S, Pinto GA, Fernandes FA. 2008. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 15(1):95-100.
- Rop O, Balik J, Řezníček V, Jurikova T, Škardová P, Salaš P, Sochor J, Mlček J, Kramářová D. 2011. Chemical characteristics of fruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars. *Czech Journal of Food Sciences* 29(1):65-73.
- Saberi M, Modarres-Sanavy SA, Zare R, Ghomi H. 2018. Amelioration of photosynthesis and quality of wheat under non-thermal radio frequency plasma treatment. *Scientific reports*8(1):11655.
- Sacchetti G, Cocci E, Pinnavaia G, Mastrocola D, Rosa MD. 2008. Influence of processing and storage on the antioxidant activity of apple derivatives. *International journal of food science & technology* 43(5):797-804.
- Sanai F, Mortazavi SA, Tabatabai F, Shahidi F. 1398. Investigating the effect of cold plasma treatment on reducing microbial load and physicochemical properties of turmeric, *Journal of Food Science and Technology* 17(99) (persian).
- Selvamuthukumar M, Shi J. 2017. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety* 1(1):61-81.
- Semnani SN, Hajizadeh N, Alizadeh H. 2017. Antibacterial effects of aqueous and organic quince leaf extracts on gram-positive and gram-negative bacteria. *Banat's Journal of Biotechnology*. 8(16):54-61.
- Shahidi F, Nacz M. 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC press.
- Shahraki H, Mohebi F, Shahidi M and Azarpajoh FE. 2016. The effect of extracting pomegranate peel with the help of ultrasonic probe on phenolic compounds. The second international conference and the third national conference on the application of new technologies in engineering sciences, Mashhad, Iran (persian).
- Shirzad H, Niknam V, Taheri M, Ebrahimzadeh H. 2017. Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC-ESI-DAD-MS. *Journal of food science and technology* 54:2361-71.
- Sun Y, Ma G, Ye X, Kakuda Y, Meng R. 2010. Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry* 17(4):654-61.
- Tavakoli Lahijani SA, Shahidi F, Habibian M, Koocheki A. 2022. Evaluation of the effect of non-thermal plasma on the physicochemical, technological and functional properties of wheat flour. *Iranian Food Science & Technology Research Journal* 18(2).
- Vaez H, Hamidi S, Arami S. 2014. Potential of *Cydonia oblonga* leaves in cardiovascular disease. *Hypothesis* 12(1):1-0.
- Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry* 8(3):303-13.
- Wang B, Qu J, Luo S, Feng S, Li T, Yuan M, Huang Y, Liao J, Yang R, Ding C. 2018. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from olive (*Olea europaea*) leaves, and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *Molecules* 23(10):2513.
- Zhu Y, Li C, Cui H, Lin L. 2020. Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry. *Trends in Food Science & Technology* 99:142-51.

Žuntar I, Putnik P, Bursać Kovačević D, Nutrizio M, Šupljika F, Poljanec A, Dubrović I, Barba FJ, Režek Jambrak A. 2019. Phenolic and antioxidant analysis of olive leaves extracts (*Olea europaea* L.) obtained by high voltage electrical discharges (HVED). *Foods* 8(7):248.