

Optimizacija ORAC (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta origana (lat. Origanum vulgare)

Vučilovski, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:442370>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Martina Vučilovski

0119041339

Optimizacija ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta origana (lat. *Origanum vulgare*)

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa "zelenim otapalima" primjenom visokonaponskog pražnjenja“

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Optimizacija ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta origana (lat. *Origanum vulgare*)
Martina Vučilovski, 0119041339

Sažetak: Listovi origana (lat. *Origanum vulgare*) dobar su izvor fenolnih spojeva (antioksidansa) s velikom mogućnošću primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Cilj ovog eksperimenta bio je efikasno provesti ekstrakciju suhih listova origana uz pomoć visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED metode). Dobiveni rezultati uspoređeni su s efikasnošću ekstrakcije konvencionalnom metodom. Tretman HVED-om provodio se s različitim vremenom tretiranja, različitim otapalima, različitim radnim plinovima i pri različitim naponima. Kod dobivenih vrijednosti može se uočiti djelomična serija pravilnosti. Prilikom povećanja volumnog udjela etanola, vremena tretiranja i napona dolazi do povećanja vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Najveći prinos bio je kod uzoraka koji su tretirani 9 min, pri 20/25 kV i u 50 %-tnoj otopini etanola.

Ključne riječi: Origano, fenolni spojevi, HVED metoda, ORAC

Rad sadrži: 23 stranice, 8 slika, 5 tablica, 18 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Komentor: /

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Optimization of Oxygen Radical Absorbance Capacity method for antioxidant activity of extracts from oregano (lat.*Origanum vulgare*)

Martina Vučilovski, 0119041339

Summary: Oregano leaves (lat. *Origanum vulgare*) are useful source of phenolic compounds (antioxidants) with great possibility of application in Pharmaceutical and Food industry. The goal of this experiment was to efficiently carry out an extraction of dried oregano leaves using high voltage electric discharge (HVED method). The results were compared with the extraction efficiency by conventional method. The HVED treatment was performed with different treatment times, different solvents, different working gases and at different voltages. Sample values shows a partial series of regularities. With a rise in ethanol concentration, time and voltage treatment, an increase in antioxidant capacity is observed. The greatest yield was observed in samples which were treated with argon for 9 min, at 20/25 kV and in a 50% ethanol solution.

Keywords: Oregano, phenolic compounds, HVED method, ORAC
Thesis contains: 23 pages, 8 figures, 5 tables, 18 references, 0 supplements
Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Dr. sc.Filip Šupljika, Assistant Professor

Co-mentor: /

Technical support and assistance: Dr. sc.Filip Šupljika, Assistant Professor

Thesis defended: June 29, 2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ORIGANO (LAT. ORIGANUM VULGARE)	2
2.2. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDANSI	3
2.3. OKSIDACIJSKI STRES I SLOBODNI RADIKALI	4
2.4. KONVENCIONALNE TEHNIKE EKSTRAKCIJE	5
2.5. NEKONVENCIONALNE TEHNIKE EKSTRAKCIJE	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. BILJNI MATERIJALI	8
3.1.2. KEMIKALIJE.....	8
3.1.3. OPREMA I PRIBOR	8
3.1.4. PRIPREMA OTOPINA	9
3.2. METODE	10
3.2.1. PRIPREMA UZORAKA ZA HVED.....	10
3.2.2. GENERIRANJE PLAZME	12
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ORAC METODOM.....	13
3.2.4. OBRADA PODATAKA	15
3.2.5. IZRADA BAŽDARNOG DIJAGRAMA	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČCI	20
6. POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

Poznavanje začinskog bilja kao izvora ljekovitih komponenti seže čak u doba Egipćana. Evolucijskim razvitkom i napredovanjem tehnologije rasla je želja za poznavanjem i otkrivanjem komponenata koje su zaslužne za ljekovita svojstva začinskog bilja. Današnja znanost i tehnologija omogućuje izbor velikog spektra metoda obrade sirovina kako bi, ovisno o potrebi, izolirali ili detektirali određeni spoj. U ovom eksperimentu proveda se klasična ekstrakcija i ekstrakcija uz pomoć visokonaponskog električnog pražnjenja s ciljem pojačanog izlučivanja bioaktivnih molekula iz origana. Dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene su ORAC metodom (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Obrada i prikaz podataka provedena je softverskim alatima Origin, FL WinLab (Perkin Elmer) i Excel (Microsoft). Cilj ovog eksperimenta bio je dokazati da uzorci tretirani visokonaponskim električnim pražnjenjem pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na uzorke kod kojih je provedena klasična ekstrakcija.

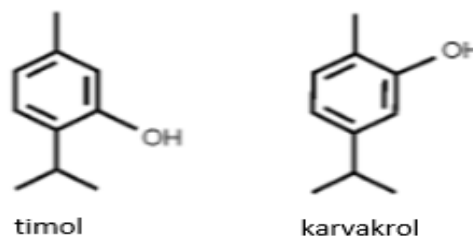
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Origano (lat. *Origanum vulgare*)

Origano (lat. *Origanum vulgare*) spada u porodicu usnača (*Lamiaceae*). To su zeljaste jednogodišnje biljke i polugrmovi čiji su vjenčići u obliku gornje i donje usne. Sve usnače se mogu naći od umjereno vlažnih do sušnih područja. Naseljavaju svijetla, osunčana i otvorena staništa. Origano (Slika 1.) se može pronaći na području Sredozemlja i u istočnoj Aziji. Grm je visine 50 cm, a listovi su aromatičnog i blago gorkog okusa. U kulinarstvu se koriste listovi u svježem ili sušenom obliku, a u medicini u obliku raznih preparata protiv probavnih teškoća, kod oboljenja dišnih puteva i umirivanja živčanog sustava (Tadić, 2019). Za aromu eteričnog ulja origana zaslužni su spojevi timol i karvakrol (Slika 2.) (Van Wyk, 2013). Karvakrol (2-izopropil-6-metilfenol) je fenolni monoterpenoid koji ima sposobnost djelovanja protiv raznih patogena kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Bacillus cereus* (Sharifi-Rad i sur., 2018). Timol (2-izopropil-5-metilfenol) se strukturno razlikuje od karvakrola po položaju hidroksilne skupine na fenolnom prstenu. Istraživanjima se utvrdilo da posjeduje antimikrobno, antioksidativno i protuupalno djelovanje (Andričević, 2019.). Osim karvakrola i timola, ulje origana sadrži flavonoide, ružmarinsku kiselinu, vitamine A i C, te brojne minerale.



Slika 1. Origano (Anonymus 1, 2019)

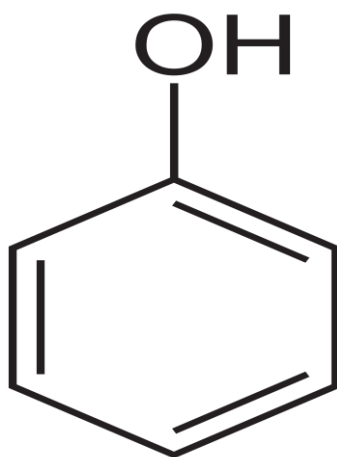


Slika 2. Timol i karvakrol (Van Wyk, 2013)

2.2. Fenolni spojevi i antioksidansi

Osnovnu strukturu fenolnih spojeva (Slika 3.) čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Prema osnovnoj strukturi mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Mogu se pronaći u životinjskim i biljnim stanicama, no većinski prevladavaju u biljnim (sjemenke, kora, listovi, pokožica itd.). Biološka aktivnost fenolnih spojeva objašnjava se njihovim antioksidacijskim djelovanjem (Dujmović, 2018). Antioksidansi su prirodne ili sintetske tvari koje blokiraju aktivnost slobodnih radikala u štetnom djelovanju na stanice. Antioksidansi djeluju putem dva različita mehanizma: mehanizmom razbijanja lančane reakcije i preventivnim mehanizmom.

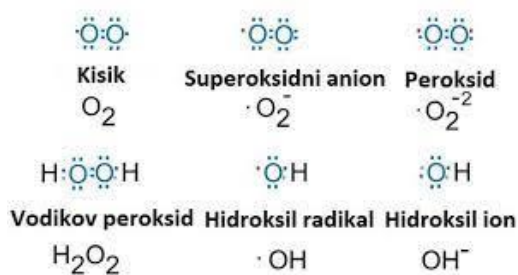
Prvim mehanizmom nastali radikal dolazi u interakciju s različitim molekulama tvoreći drugi radikal koji potiče daljnju lančanu reakciju. Antioksidansi svojom oksidacijom neutraliziraju ili „čiste“ nastale radikale i tako sprečavaju djelovanje radikala. Preventivnim mehanizmom antioksidansi djeluju na radikale i prije pokretanja lančane reakcije (Bošnjaković, 2017). Fenoli svoju „zaštitnu ulogu“ pripisuju sposobnosti sparivanja slobodnog elektrona, keletnom vezanju iona prijelaznih iona, aktivaciji antioksidacijskih enzima i inhibiranju oksidaza. Fenoli se u biljci mogu pronaći u obliku glikozida ili estera šećera otopljenih u vakuoli. Topivost u vodi im ovisi o prisutnosti hidroksilnih skupina, s time da povećanjem broja hidroksilnih grupa rasti topivost (Dujmović, 2018). Fenolni spojevi prisutni u origanu su, već spomenuti, timol i karvakrol.



Slika 3. Osnovni oblik fenola (Anonymus 2, 2022)

2.3. Oksidacijski stres i slobodni radikali

Najpoznatiji slobodni radikali su reaktivni metaboliti kisika (ROS) i reaktivni metaboliti dušika (RNS). U normalnim uvjetima ROS i RNS nastaju zahvaljujući enzimima NO-sintazi i NAD(P)H-oksidazi. U niskim koncentracijama sudjeluju u održavanju homeostaze, ali povećana proizvodnja slobodnih radikala uzrokovat će antioksidacijski stres što može dovesti do oštećenja stanične strukture, membrana, lipida, proteina i DNA. Slobodni radikali su molekule ili dijelovi molekula koji u atomskim orbitalama imaju nesparene elektrone. Superoksidni anion (Slika 4.) nastat će redukcijom tripletnog stanja molekularnog kisika. Superoksid dismutaza pretvara superokside u vodikov peroksid. Ako stanica sadrži nisku koncentraciju prijelaznih metala (npr. željezni ion) vodikov peroksid prelazi u vrlo reaktivne hidroksilne radikale. U normalnim uvjetima vodikov peroksid uz pomoć katalaze ili glutathion peroksidaze prelazi u vodu (Postić, 2012). Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže između staničnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija u smjeru oksidacije. Utjecaj oksidacijskog stresa na organizam je složen te ovisi o vrsti oksidansa, njegovom djelovanju, sposobnosti oporavka stanice te mjestu i intenzitetu stvaranja radikala (Vrbanić, 2018).



Slika 4. Reaktivni spojevi kisika (Anonymus 3, 2021)

2.4. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

U konvencionalne tehnike ekstrakcije ubraja se destilacija, ekstrakcija otapalima i hladno prešanje.

Destilacija je toplinski separacijski proces koji se temelji na različitoj hlapljivosti, odnosno temperaturi vrelišta višekomponentnih smjesa. Lakše hlapljive komponente zaostaju u kondenzatu, dok teže hlapljive ostaju u originalnoj smjesi. Ovaj proces troši velike količine energije za samu provedbu. Što je relativna hlapljivost veća, odnosno što je razlika u hlapljivosti između komponenti veća, destilacija će biti uspješnija.

Ekstrakcija otapalom može se provoditi kada se željeni analit nalazi u čvrstom ili tekućem obliku. Proces se odvija u nekoliko koraka. Najprije je potrebno uzorak dovesti u kontakt s otapalom za ekstrakciju. U ovom koraku se odvija difuzija, migracija određenih čestica u otopinu zbog razlike u koncentraciji. Kod tekućih uzorka brzina difuzije analita bit će veća od brzine difuzije analita u čvrstom uzorku. Naime, kod analita u čvrstim uzorcima moraju se nadjačati veze između samog analita i matice kako bi se analit mogao slobodno ekstrahirati u otapalo. Prilikom izbora otapala potrebno je voditi brigu o različitim svojstvima otapala: polarnosti, temperaturi vrelišta, viskoznosti, inertnosti, zapaljivosti i cijeni. Drugi korak je separacija otapala s analitom od matice uzorka. Najčešće se provodi taloženjem, dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem. Treći korak je uklanjanje otapala pomoću destilacije, kristalizacije ili uparivanja (Kaselj, 2012). U ovom eksperimentu imali smo čvrst materijal (listove origana) čije smo fenolne spojeve ekstrahirali pomoću etanola, a zatim separirali filtracijom.

Hladno prešanje je mehanička metoda ekstrakcije kojom se izdvaja sirovo ulje pod visokim tlakom. Materijal je potrebno prethodno osušiti kako bi prinos bio veći. Princip je da materijal (najčešće sjemenke) putuje iz većeg zatvorenog prostora u manji pri čemu nastaje tlak i ulje se cijedi. Radi trenja materijala dolazi do povećanja temperature, a najveća dopuštena temperatura je 50 °C. Glavni dijelovi preše su puž, koš koji ga obavija, uređaj za punjenje i doziranje materijala, uređaj za regulaciju debljine pogače, zupčasti prijenosnik i kućište (Biondić, 2018).

2.5. Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije

U nekonvencionalne metode spadaju ekstrakcija superkritičnim fluidom, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija ultrazvukom i ekstrakcija mikrovalovima.

Ekstrakcija superkritičnim fluidom većinom se provodi ugljikovim dioksidom (iznad 7,3 MPa i iznad 31 °C). U „kritičnom“ području fluida prevladavaju karakteristike i tekućine i plina. Prednosti su što pokazuje svojstva tekućeg otapala, a također ima pozitivne karakteristike plina, kao što je mala viskoznost i dobra sposobnost difuzije. Tekući ugljikov dioksid pumpa se kroz izmjenjivač topline iz kondenzatora u posudu za ekstrakciju. Podešavanjem tlaka i temperature na vrijednosti iznad kritičnih dobije se superkritični fluid u ekstraktoru. Nakon tretmana slijedi dekompresija, ugljikov dioksid prelazi u plinovito stanje te se vraća u kondenzator, a ekstrakt zaostaje u posudi za separaciju.

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*) odvija se pri povišenoj temperaturi koja ubrzava ekstrakciju i povišenom tlaku koji omogućuje brži prijenos mase. Vrijeme ekstrakcije je kratko (oko 15 minuta), koristi se mala količina otapala koja mogu biti čista ili u smjesi. Tehnika je relativno nova i ne koristi se često radi visoke cijene ASE uređaja i potrebom za obradom i pročišćavanjem materijala prije analize.

Ekstrakcija ultrazvukom temelji se na djelovanju kavitacije na staničnu stijenkku koja pozitivno utječe na prijenos mase i penetraciju otapala u materijal. Ultrazvučni val karakterizira valna duljina, frekvencija, amplituda i koeficijent prigušenja. Frekvencija se podešava ispod 1 MHz kako bi došlo do pojave kavitacije. Kavitacijski mjehurići nastaju prolaskom vala kroz biljni materijal pri čemu dolazi do nastanka područja promjenjivih ekspanzija i kompresija tlaka. Djelovanjem negativnog tlaka oni se šire, a djelovanjem pozitivnog tlaka naglo se urušavaju u sebe.

Ekstrakcija mikrovalovima većinom se provodi u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi pri čemu će tlak ovisiti o količini i vrelištu otapala. Drugi način provedbe je pri atmosferskom tlaku u mikrovalnim reaktorima. Princip djelovanja je da mikrovalovi ulaze u interakcije s dipolima polarnih komponenata materijala, pri čemu dolazi

do rotacije dipola i zagrijavanja polarnih molekula. Prednosti ovog postupka su kratko trajanje procesa i mala količina otapala potrebnog za ekstrakciju. Nedostaci su visoka cijena aparature, mogućnost izbora samo polarnih otapala i potreba za naknadnim pročišćavanjem ekstrakta (Dizdar, 2020).

Ekstrakcija električnom energijom koristila se u ovom eksperimentu te će biti detaljnije objašnjena pod naslovom Generiranje plazme.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijali

U ovom istraživanju korišteni su suhi listovi origana (lat. *Origanum vulgare*) osigurani iz lokalne ljekarne (Suban d.o.o., Samobor). Listovi origana čuvali su se u polietilenskim vrećama na tamnom i suhom mjestu do ekstrakcije. Raspodjela veličine biljnih čestica dobivena mljevenjem bila je: 90% čestica do promjera $d(0,9) \leq 164,315 \mu\text{m}$; 50% čestica do srednjeg promjera $d(0,5) \leq 297,345 \mu\text{m}$; a 10% čestica do promjera $d(0,1) \leq 461,460 \mu\text{m}$. (Nutrizio i sur., 2020a; Nutrizio i sur., 2020b).

3.1.2. Kemikalije

- AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropanamid)-dihidroklorid) (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96%-tni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fluorescein (BioReagent, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Fosfatni pufer, $\text{pH} = 7$, $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Fisher chemical, Loughborough, UK)
- Natrijev hidrogenfosfat 99+%-tni (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Trolox (Acros Organics, New Jersey, USA)

3.1.3 Oprema i pribor

- analitička vaga, Adam Equipment, Milton Keynes, UK
- automatske pipete volumena $0.5\text{-}10 \mu\text{l}$, $10\text{-}100 \mu\text{l}$ i $100\text{-}1000 \mu\text{l}$

- bočice volumena 5 mL
- falcon epruvete volumena 50 mL
- generator plazme, IMP-SSPG-1200, Impel grupa, Zagreb, Hrvatska
- kvarcne kivete
- odmjerne tikvice volumena 100 mL i 500 mL
- pipete volumena 5 mL, 25 mL, 50 mL
- spektrofluorimetar, PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- staklene čaše volumena 100 mL, 250 mL
- stalak za automatske pipete
- štoperica
- vodena kupelj, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- vortex, IKA, Staufen, Njemačka

3.1.4. Priprema otopina

Za otapanje svih kemikalija korišten je fosfatni pufer koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Najprije se pripremi početni fosfatni pufer koncentracije $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ tako da se 6,242 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ otopi u 200 mL destilirane vode te 5,687 g Na_2HPO_4 u 200 mL destilirane vode. Zatim se u odmjernu tikvicu od 200 mL doda 61 mL otopine Na_2HPO_4 koncentracije $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ i 39 mL otopine $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ koncentracije $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Fosfatni pufer koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$ pripremi se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL doda 37,5 mL otopine fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ i odmjerna tikvica se nadopuni vodom do oznake.

Fluorescentna proba (fluorescein) pripremljena je otapanjem natrijeve soli fluoresceina. Otopina 1 priprema se otapanjem 15 mg natrijeve soli fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Otopina 2 priprema se razrjeđivanjem 100 μL otopine 1 sa 10 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Konačna otopina 3 priprema se razrjeđivanjem 50 μL otopine 2 sa 50 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Otopine 2 i 3 pripremane su svježije svaki dan, dok se otopina 1 razdijelila u alikvote i svaki tjedan se koristio novi alikvot. Fluorescein je fotosenzibilan te se iz tog razloga drži zaštićen od svjetlosti. Svo posuđe u kojem se drži, kao i kiveta u koju se dodaje fluorescein, zamatano

je u aluminijsku foliju kako bi se što manje izlagalo svjetlosti.

Izvor slobodnih radikala, AAPH, priprema se otapanjem 0,207 g AAPH u 5 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Otopina AAPH se također pripremala svježja svaki dan, držala u hladnjaku te se iz njega vadila samo za potrebe provođenja eksperimenta.

Otopine Troloxa korištene za izradu baždarnog pravca pripremaju se tako da se 6,26 mg Troloxa otopi u 50 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$ te se iz tako pripremljene otopine Troloxa koncentracije $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ priprema 6 razrjeđenja (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM i 3.125 μM).

Radila su se različita razrjeđenja (300x, 450x, 550x ili 1000x), ovisno o količini antioksidansa u uzorku. Isprobavalo se s najmanjim razrjeđenjem, a ukoliko je mjerenje trajalo više od 90 minuta, napravilo se veće razrjeđenje. Razrjeđenje 300x priprema se razrjeđivanjem 5 μL uzorka sa 1495 μL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$, razrjeđenje 450x sa 4 μL uzorka i 1796 μL pufera, razrjeđenje 550x sa 3 μL uzorka i 1647 μL pufera te razrjeđenje 1000x sa 3 μL uzorka i 2997 μL pufera.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka za HVED

Prije tretiranja plazmom potrebno je pripremiti ekstrakt origana uz pomoć klasične ekstrakcije koji će služiti za usporedbu antioksidacijskih vrijednosti s uzorcima tretiranim HVED-om. Uzorak iz polietilenske vreće nasumično se uzorkuje i izvaže se 30 uzoraka čija je masa 1 g. Također, pripremi se 50%-tni i 25%-tni etanol, dok je kao 0% -tni korištena destilirana voda. Za pripremu netretiranih uzoraka izvaže se šest uzoraka od 1 g, kojima se doda 50 mL 0%-tnog, 25%-tnog ili 50%-tnog etanola. Prvi uzorak sa 0% etanola miješa se 3 minute staklenim štapićem. Drugi uzorak sa također 0%-tnim etanolom miješa se 9 minuta. Zatim se nastavlja s pripremom netretiranih uzoraka, ali se mijenja udio etanola (25% i 50%) i duljina miješanja (3 min i 9 min). Nakon miješanja uzorci se profiltriraju, a filtrat se sprema u epruvete, koje se čuvaju u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ za daljnju analizu. Poželjno je uzeti alikvot filtrata svakog uzorka kako bi se čim manje odmrzavanjem utjecalo na svojstva uzorka. Šest netretiranih uzoraka uspoređivano je s tretiranim uzorcima na temelju vremena tretiranja i udjela etanola u

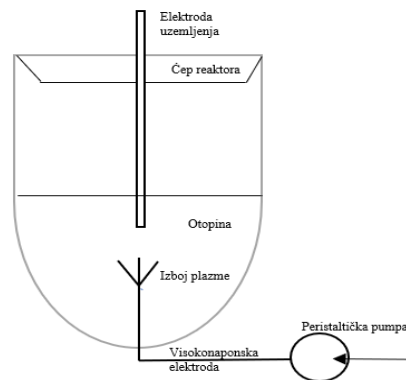
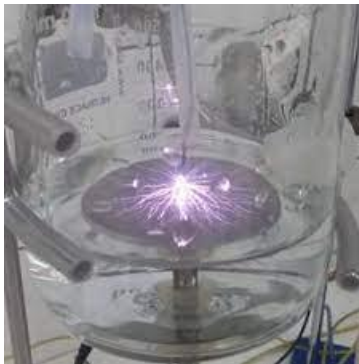
uzorku. U tablici 1. dani su podaci potrebni za pripremu tretiranih uzoraka. Prije samog tretiranja uz pomoć HVED metode na upravljačkoj kontroli podesi se željeni napon i vrijeme, jakost struje na 30 mA, frekvencija pulsa na 100 Hz i trajanje impulsa na 0.40 mikrosekundi. Razmak između elektroda je bio 1,5 cm. Plin (dušik ili argon) je pušten pri 150 bara i nakon toga se pokreće program pritiskom na tipku start. Nakon tretiranja uzorak je profiltriran, a filtrat je spremljen u epruvete te se čuva u zamrzivaču na -20 °C. Dobivena su 24 tretirana uzorka, koji se mogu uspoređivati s netretiranim uzorcima na temelju vremena tretiranja i volumnog udjela etanola, a međusobno na temelju napona i plina koji se koristio prilikom tretiranja. Također je poželjno alikvotirati uzorke radi zadržavanja svojstava.

Tablica 1. Podaci za tretiranje uzoraka

	Plin	Vrijeme tretiranja / min	Napon / kV	Udio etanola / %
OA1	Argon	3	15	50
OA2		9	15	0
OA3		3	15	0
OA4		3	20	0
OA5		9	20	25
OA6		9	15	25
OA7		9	15	50
OA8		9	20	50
OA9		3	20	25
OA10		9	20	0
OA11		3	20	50
OA12		3	15	25
ON1	Dušik	3	20	50
ON2		9	20	0
ON3		3	20	0
ON4		3	25	0
ON5		9	25	25
ON6		9	20	25
ON7		9	20	50
ON8		9	25	50
ON9		3	25	25
ON10		9	25	0
ON11		3	25	50
ON12		3	20	25

3.2.2. Generiranje plazme

Ovim eksperimentom, uz pomoć plinova argona i dušika, generirala se hladna plazma (Slika 5.). Peristaltička pumpa dovodi plin do ekstrakta, a kroz visokonaponsku elektrodu prolazi visok napon i dolazi do ionizacije plina koji se pretvara u plazmu. Sam postupak ionizacije može se vidjeti golim okom. Izboji plazme, kavitacijski mjehurići i turbulencije u ekstraktu pomažu pri miješanju otopine i jednolikom tretiranju uzorka. Na drugom kraju tikvice (Slika 6.) priključeno je uzemljenje, a sustav se dodatno izolirao komorom od pleksiglasa. Pri sastavljanju i vađenju uzoraka, kao mjera opreza, korištene su sigurnosne izolacijske rukavice.



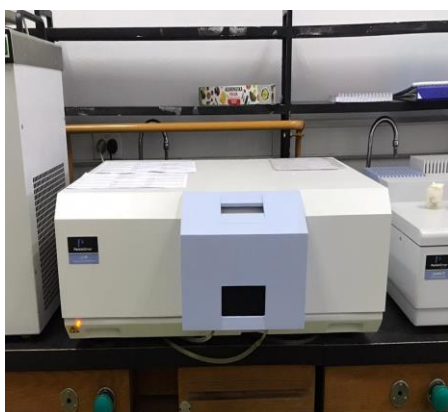
Slika 5. Generiranja plazme (Mandura, 2016.) Slika 6. Vlastita shema uređaja za plazmu

Plazma generator koji se koristio je IMP-SSPG-1200. Služi za precizno i računalno kontroliranje DC napona od 1 kV do 30 kV, uz jakost struje od 40 mA. Moguć je velik raspon podešavanja frekvencije rezolucije do 0,1 Hz. Dijelovi plazma generatora su upravljačka kontrola, pretvorba AC napona u visoki DC napon s pohranom energije, *H-bridge* (most) pretvarač DC napona u pravokutne impulse, zaštitna kontrola visokog napona i plazma reaktor. Na upravljačkoj kontroli mogu se namještati parametri kao što je amplituda izlaznog napona (0 kV do 30 kV), širina impulsa (10% do 90%), frekvencija impulsa ovisno o teretu i strmina impulsa ovisno o teretu (Solid state plazma generator, 2017).

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Postupak određivanja:

Mjerenja se provode spektrofлуорimetrom (PerkinElmer LS 55 Fluorescence Spectrometer) pri $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 515 \text{ nm}$ pri temperaturi od $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Slika 7.). U kivetu se doda 2,25 mL fluoresceina (otopina 3) i 0,375 mL uzorka (fosfatni pufer koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$ ili Trolox ili razrijeđeni uzorak). Tako pripremljene otopine inkubiraju se 10 minuta pri $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon 10 minuta doda se 0,375 mL AAPH te se pokrene mjerenje.



Slika 7. a) Spektrofлуорimetar Perkin Elmer LS 55 Fluorescence Spectrometer b) termostat (vlastite fotografije)

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina Troloxa koncentracije $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ na način da se otopi 6,26 mg Troloxa u 50 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 0,075 \text{ mol dm}^{-3}$. Iz tako pripremljene otopine Troloxa koncentracije $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pripremljeno je 6 razrijeđenih otopina različitih koncentracija (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM)

Razlika površine ispod krivulje za uzorak i slijepu probu računa se:

(AUC, engl. *Area under the curve*):

$$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + 1/2 \times (R_n/R_1) \quad [1]$$

gdje je:

R_1 = vrijednost fluorescencije prvog mjerenja

R_n = vrijednost fluorescencije posljednjeg mjerenja

Relativna ORAC vrijednost računa se na sljedeći način:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost} = [(AUCU - AUCSP) / (AUCTRX - AUCSP)] \cdot k \cdot a \cdot h \text{ (}\mu\text{mol TE/g uzorka)} \quad [2]$$

gdje su:

AUCU = antioksidacijski kapacitet uzorka

AUCSP = antioksidacijski kapacitet slijepa probe

AUCTRX = antioksidacijski kapacitet Troloxa

k = faktor razrjeđenja

a = molarna koncentracija Troloxa

h = $V_{\text{ekstrakta}} / m_{\text{uzorka}}$

Rezultati su izraženi kao mmol TE/100 g s.tv. uzorka.

3.2.4. Obrada podataka

Za statističku analizu koristio se program *OriginLab*. Eksperimentalno je dobiveno 12 vrijednosti za svaki plin (argon i dušik) kod tretiranih uzoraka te 6 vrijednosti za netretirane uzorke. Tri nezavisne varijable koje su se mijenjale bile su:

1. koncentracija etanola (0 %, 25 % ili 50 %)
2. primijenjeni napon (15 kV ili 20 kV za argon i 20 kV ili 25 kV za dušik)
3. vrijeme obrade (3 ili 9 min)

Za točno određivanje vrijednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka, svaki eksperiment se ponovio minimalno dva puta, pri čemu je uzeta aritmetička sredina oba (ili više) mjerenja.

Za statističku obradu i prikaz podataka korišteni su softverski alati *Origin*, *FL WinLab* (Perkin Elmer) i *Excel* (Microsoft). Softverski alat *FL WinLab* integriran je u sam spektrofлуориметар i pomoću njega su provedena sva mjerenja.

Nakon termostatiranja, a prije nego što se doda radikal, pokrene se *scan.mth* metoda uz sljedeće parametre:

- početna valna duljina mjerenja (500 nm)
- završna valna duljina mjerenja (700 nm)
- valna duljina pobude (485 nm)
- ekscitacijski "slit" (5,0 nm)
- emisijski "slit" (5,0 nm)
- brzina skeniranja (500 nm/min).

Nakon što se provede *scan* metoda, doda se radikal i u što kraćem vremenu pokreće *TimeDrive* metoda uz parametre:

- valna duljina pobude (485 nm)
- valna duljina emisije (515 nm)

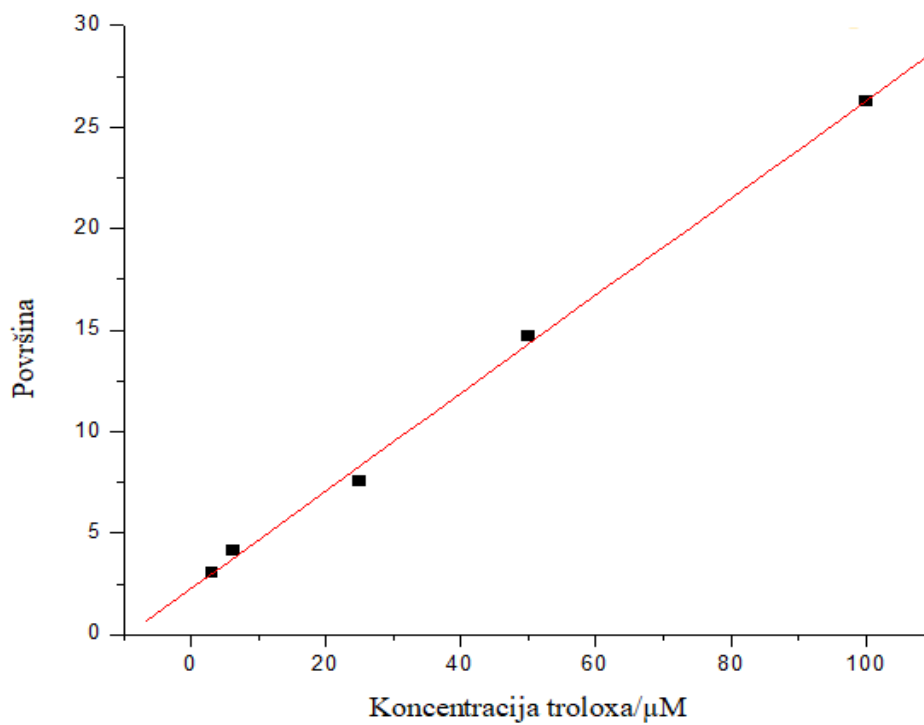
- ekscitacijski “slit” (5,0 nm)
- emisijski “slit” (5,0 nm)
- duljina mjerenja (120 minuta)
- interval prikupljanja podataka (0,01 min), uz opciju neposrednog početka mjerenja.

Metoda *TimeDrive* mora se pokrenuti u što kraćem vremenu jer samim dodatkom radikala počinje reakcija. Snimanje se zaustavlja kada vrijednost intenziteta fluorescencije stagnira 4 minute. Svako mjerenje trajalo je između 1,5 i 2 sata.

Program koji se koristi za mjerenje je *WinLab*, pri čemu dobivene datoteke imaju ekstenziju .SP (spektar) i .TD (*T-Drive*, mjerenje s dodatkom radikala). Datoteke s ekstenzijom .SP služe kao provjera da se maksimum intenziteta fluorescencije nalazi pri 515 nm. Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom alatu *OriginLabu*. Za obradu podataka u *OriginLabu* potrebno je imati spremljen dokument sa zapisanim mjerenjima (.SP i .TD datoteke). Prvo je potrebno kliknuti na karticu *New sheet* u kojem se dodaju stupci u koje se kasnije upisuju izmjerene vrijednosti i preračunavaju u željeni oblik. Dodavanje stupaca može se izvršiti desnim klikom te naredbom *Add column*. U ovom eksperimentu stupac A označavao je ime uzorka, stupac B vrijednost slijepe probe, stupac C vrijednost površine ispod krivulje koja opisuje ovisnost intenziteta fluorescencije o vremenu, stupac D razliku između stupaca C i B, stupac E izračunatu željenu veličinu uz pomoć baždarnog pravca te stupac F preračunatu vrijednost stupca E radi drugačijeg faktora razrjeđenja (ako se koristio). Nakon toga je potrebno otvoriti novi radni list *New Worksheet*. Unos željene datoteke s ekstenzijom .TD vrši se ovim redoslijedom: *File* → *Import* → *Simple single ASCM*. Nakon što se željena datoteka učitala, potrebno je označiti cijeli desni stupac te prikazati podatke grafički na sljedeći način: *Analysis* → *Normalize* → *Plot* → *Scatter*. Integriranjem površine ispod dobivene krivulje te očitavanjem zadnjeg broja koji se nalazi u desnom stupcu dobiva se tražena AUC (*Area under the curve*) vrijednost na sljedeći način: *Analysis* → *Calculus* → *Integrate*.

3.2.5. Izrada baždarnog dijagrama

Temeljem podataka dobivenih mjerenjem slijepe probe uz Trolox kao standard izrađen je baždarni dijagram (Slika 8.). Dobivena krivulja je pravac opisana sljedećom jednačinom: $y = 0,24036x + 2,2866$, pri čemu je na y -osi prikazana dobivena vrijednost površine ispod grafa uzorka, a na x -osi koncentracija troloxa.



Slika 8. Baždarni dijagram

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 2, a vrijednosti su uspoređivane po Tablici 3, Tablici 4 i Tablici 5.

Tablica 2. Tablica antioksidacijskih kapaciteta tretiranih i netretiranih uzoraka ekstrakta origana dobivena ORAC metodom

Netretirani		Tretirani			
		Argon		Dušik	
Naziv uzorka	Vrijednost/mmol TE/100 g s.tv.uzorka	Naziv uzorka	Vrijednost/mmol TE/100 g s.tv.uzorka	Naziv uzorka	Vrijednost/mmol TE/100 g s.tv.uzorka
3NO0	354,8 ± 53,8	OA1	1078,3 ± 116,5	ON1	1021,8 ± 57,1
3NO25	390,4 ± 46,1	OA2	783,6 ± 42,4	ON2	984,3 ± 63,5
3NO50	410,4 ± 13,1	OA3	523,6 ± 115,1	ON3	766,8 ± 99,5
9NO0	604,6 ± 39,9	OA4	1114,7 ± 51,9	ON4	1018,1 ± 37,9
9NO25	662,0 ± 45,2	OA5	1328,1 ± 69,7	ON5	1176,8 ± 21,3
9NO50	726,7 ± 83,7	OA6	1496,3 ± 50,9	ON6	1127,1 ± 261,6
		OA7	1658,0 ± 67,9	ON7	1449,3 ± 52,6
		OA8	1638,4 ± 56,3	ON8	1432,5 ± 2,4
		OA9	1227,3 ± 34,0	ON9	1176,3 ± 41,3
		OA10	1287,4 ± 8,8	ON10	1075,4 ± 18,3
		OA11	1322,6 ± 127,7	ON11	1204,3 ± 6,3
		OA12	985,4 ± 43,4	ON12	1008,0 ± 6,1

Tablica 3. Tablica kriterija 1

vrijeme/ min	napon/ kV	
3	20	OX1 > OX12 > OX3
3	25	OX11 > OX9 > OX4
9	20	OX7 > OX6 > OX2
9	25	OX8 > OX5 > OX10

Tablica 4. Tablica kriterija 2

vrijeme/ min	etanol/ %	
3	0	OX4 > OX3
3	25	OX9 > OX12
3	50	OX11 > OX1
9	0	OX10 > OX2
9	25	OX5 > OX6
9	50	OX8 > OX7

Tablica 5. Tablica kriterija 3

napon/ kV	etanol/ %	
20	0	OX2 > OX3
20	25	OX6 > OX12
20	50	OX7 > OX1
25	0	OX10 > OX4
25	25	OX5 > OX9
25	50	OX8 > OX11

*X=argon ili dušik

Prema dobivenim vrijednostima antioksidacijskih kapaciteta i zadanim vrijednostima parametara tretiranja visokonaponskim pražnjenjem, može se uočiti da je ekstrakcija uspješno provedena i da je antioksidacijski kapacitet tretiranih uzoraka veći u odnosu na netretirane uzorke. Parametri koji su utjecali na povećanje koncentracije antioksidansa u ekstraktu su izbor radnog plina, vrijeme izloženosti visokonaponskom električnom pražnjenju, volumni udio etanola u otapalu i primijenjeni napon.

Tablica 3. prikazuje očekivan odnos između uzoraka kada su parametri vrijeme tretiranja i napon konstantni, a volumni udio etanola promjenjiv. Pretpostavlja se da će najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti, u određenoj seriji, imati uzorak s najvećim volumnim udjelom etanola. Tablica 4. prikazuje očekivan odnos između uzoraka kada su parametri vrijeme tretiranja i volumni udio etanola u otapalu konstantni, a napon promjenjiv. Pretpostavlja se da će najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti, u određenoj seriji, imati uzorak s najvećim korištenim naponom. Tablica 5. prikazuje očekivan odnos između uzoraka kada su parametri napon i volumni udio etanola konstantni, a vrijeme tretiranja promjenjivo. Pretpostavlja se da će uzorak u određenoj seriji, koji je dulje tretiran, imati najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti.

Kod uzorka ekstrakta origana došlo je do odstupanja od pravilnosti. Uzorak ON8 čija je ORAC vrijednost $1432,5 \pm 2,4$ mmol TE/100 g s.tv.uzorka trebao bi imati veću vrijednost antioksidacijske aktivnosti od uzorka ON7 čija je ORAC vrijednost $1449,3 \pm 52,6$ mmol TE/100 g s.tv.uzorka. Može se uočiti da su vrijednosti slične i ako se uzme donja granica za uzorak ON7 vrijednosti su u očekivanom odnosu. Također, do odstupanja dolazi između uzoraka OA8-OA7 i uzoraka OA5-OA6. Uzorak OA8 bi trebao imati veću vrijednost antioksidacijske aktivnosti od uzorka OA7. Manipulacijom vrijednostima standardne devijacije i koristeći tablice kriterija ta dva uzorka mogu biti unutar očekivanih vrijednosti. Kod uzoraka OA5 i OA6 došlo je do većih odstupanja i nije moguće pretpostaviti vrijednosti na temelju dobivenog rezultata i standardne devijacije. Do spomenutog odstupanja moglo je doći radi nepravilnog uzorkovanja, nehomogenosti uzorka ili raspada spoja fluoresceina zbog nedostatka crne komore. Odstupanja su se pokušala smanjiti tako da su otopina 2 i otopina 3 fluoresceina svježe pripremane svaki dan mjerenja.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu optimizirana je ORAC metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata origana (lat. *Origanum vulgare*) dobivenog pomoću HVED metode:

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog materijala (listova origana) uspješno je provedena pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED) korištenjem destilirane vode te smjese destilirane vode i etanola
2. Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta origana potječe od biološki aktivnih spojeva
3. Potvrđeno je pozitivno djelovanje HVED metode na povećanje antioksidacijskog kapaciteta. Svi tretirani uzorci imali su veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta od netretiranih uzoraka (pri istoj temperaturi)
4. Povećanje vremena tretiranja, volumnog udjela etanola ili napona dovodi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta uzorka
5. Metoda je osjetljiva te nepravilnim postupanjem može doći do odstupanja rezultata
6. Radi postizanja točnijih rezultata potrebno je imati crnu komoru za rad s fluoresceinom
7. ORAC metoda je standardizirana metoda, što olakšava interpretaciju rezultata i uspoređivanje antioksidacijske aktivnosti između različitih uzoraka
8. ORAC metoda je dugotrajna i ovisi o temperaturi

6. POPIS LITERATURE

Anonymous 1 (2019.) Origano, < <https://www.gastronomija.hr/origano-zacin/> >. Pristupljeno 8. ožujka 2022.

Anonymous 2 (2022.) Fenoli, < <https://hr.wikipedia.org/wiki/Fenoli> >. Pristupljeno 12. travnja 2022.

Anonymous 3 (2021.) An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells, < <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/> >. Pristupljeno 21. Travnja 2022.

Andričević, K. (2019.) Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, <urn:nbn:hr:163:952291> Pristupljeno 09.ožujka.2022.

Biondić, A. (2018.) Utjecaj hladnog prešanja i antioksidansa na proizvodnju i stabilnost lanenog ulja (završni rad), Poljoprivredni odjel, Veleučilište u Požegi, Požega, <urn:nbn:hr:112:961502> Pristupljeno: 13.ožujka.2022.

Bošnjaković, A. (2017.) Antioksidansi i njihov doprinos zdravlju i ljepoti kože (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, <urn:nbn:hr:182:147121> Pristupljeno 13.ožujka.2022.

Dizdar, L. (2020.) Bioaktivni spojevi i antioksidacijska aktivnost mirte, tršlje i lovora (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, <urn:nbn:hr:159:116474 > Pristupljeno: 13.ožujka.2022.

Dujmović, M. (2018.) Sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) u različitim razvojnim stadijima (diplomski

rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, <urn:nbn:hr:217:606780> Pristupljeno 12.ožujka.2022.

Kaselj, I. (2012.) Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenata ultrazvukom (završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nutrizio, M., Gajdoš Kljusurić, J., Marijanović, Z., Dubrović, I., Viskiće, M., Mikolaj, E., Chemat, F. and Režek Jambrak, A. (2020) The Potential of High Voltage Discharges for Green Solvent Extraction of Bioactive Compounds and Aromas from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)—Computational Simulation and Experimental Methods. *Molecules* [online] **25** (16). doi:10.3390/molecules25163711

Nutrizio, M., Maltar Strmečki, N., Chemat, F., Duić, B., Režek Jambrak, A. (2021) High Voltage Electrical Discharges in Green Extractions of Bioactives from Oregano Leaves (*Origanum vulgare* L.) Using Water and Ethanol as Green Solvents Assessed by Theoretical and Experimental Procedures. *Food Engineering Reviews* **13**, 161–174. doi:10.1007/s12393-020-09231-2

Mandura, A. (2016.) Primjena hladne plazme u inaktivaciji mikroorganizma čiste kulture E.coli (završni rad), Prehrambeno-biotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Postić, S. (2012.) Slobodni radikali i antioksidansi u normalnim fiziološkim funkcijama i bolesti ljudi (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, <urn:nbn:hr:217:23823> Pristupljeno 12.ožujka.2022.

Solid state plasma generator (2017.)

Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi-Rad, J. (2018.) Carvacrol and

human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* **32** (9), 1675-1687. doi: 10.1002/ptr.6103

Tadić, K. (2019). Osnovni elementi navodnjavanja u uzgoju bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) i origana (*Origanum vulgare*) (diplomski rad), Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, <urn:nbn:hr:151:323872> Pristupljeno 09.ožujka.2022.

Van Wyk Ben-Erik (2013) *Culinary of the world-Spices&Herbs of the world*, str.198.-199

Vrbanić, I. (2018.) Određivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta metodom spektrofotometrije u mladih ispitanika na dijeti s visokim udjelom soli (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, Osijek, <urn:nbn:hr:152:385394> Pristupljeno: 12.ožujka.2022.

Izjava o izvornosti

Ja Martina Vučilovski izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Martina Vučilovski
Vlastoručni potpis