

Antimikrobna aktivnost ekstrakata cvijeta industrijske konoplje

Rončević, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:834179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

Klara Rončević
0125164596

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA
CVIJETA INDUSTRIJSKE KONOPLJE**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Razvoj inovativnog postupka proizvodnje CBD ulja iz cvijeta industrijske konoplje i novih visokotehnoloških proizvoda - ekstrakata iz organskih poljoprivrednih sirovina

Mentor: dr. sc. Karla Hanousek Čiča

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Antimikrobna aktivnost ekstrakata cvijeta industrijske konoplje

Klara Rončević, 0125164596

Sažetak: Istraživanja industrijske konoplje, *Cannabis sativa*, navode sposobnost antimikrobnog djelovanja ekstrakata ove biljke posebice na gram-pozitivne bakterije, uključujući multirezistentne patogene. U ovome je radu uspoređena antimikrobna aktivnost triju ekstrakata cvijeta industrijske konoplje koji su dobiveni različitim metodama ekstrakcije: klasičnom, mikrovalnom i ultrazvučnom. Ekstrakti su pripremljeni u karboksiliranom i dekarboksiliranom obliku u koncentracijama do 10 mg/mL. Ispitivanje je provedeno na gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, bakterijama mliječne kiseline i kvascima. Antimikrobna aktivnost određena je primjenom standardne disk difuzijske metode, dok je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) određena pomoću resazurin boje. Osjetljivima su se pokazale jedino gram-pozitivne bakterije s većom osjetljivošću na karboksilirane uzorke u usporedbi s dekarboksiliranim. Najniže MIK, 0,0156 mg/mL za *Staphylococcus aureus* i 0,25 mg/mL za *Bacillus subtilis*, zabilježene su za ekstrakte dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom. Suprotno tome, gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimurium*) te bakterije mliječne kiseline i kvasci nisu pokazali osjetljivost na testirane ekstrakte.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, kanabinoidi, industrijska konoplja, ekstrakcija

Rad sadrži: 34 stranice, 8 slika, 3 tablice, 37 literaturnih navoda

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: dr. sc. Karla Hanousek Čiča

Datum obrane: 08. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Technology Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antimicrobial Activity of Industrial Hemp Inflorescence Extracts

Klara Rončević, 01251564596

Abstract: Studies of industrial hemp (*Cannabis sativa*) have confirmed antimicrobial efficacy of its' extracts, especially on Gram-positive bacteria, including multidrug-resistant pathogens. This study was conducted to compare antimicrobial activity of three different samples obtained from the same hemp inflorescence extracted using traditional, microwave and ultrasound assisted extraction. Extracts were used in carboxylated and decarboxylated form in concentrations up to 10 mg/mL. Antimicrobial activity was tested on gram-positive and gram-negative bacteria, lactic acid bacteria and yeast. The antimicrobial effect was evaluated using the standard disc-diffusion method, while minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using resazurin colorimetry. Only Gram-positive bacteria have shown sensitivity to all extracts, with a higher sensitivity to carboxylated extracts compared to the decarboxylated extracts. Lowest MIC, 0.0156 mg/mL for *Staphylococcus aureus* and 0.25 mg/mL for *Bacillus subtilis* was exhibited by the ultrasound assisted extracts. Conversely, no discernible indications of inhibition were observed within Gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. typhimurium*), lactic acid bacteria and yeast.

Keywords: antimicrobial activity, cannabinoids, industrial hemp, extraction

Thesis contains: 34 pages, 8 figures, 3 tables, 37 references

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: Karla Hanousek Čiča, PhD

Thesis defended: September 8, 2023

Sadržaj

1. UVOD	2
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA	3
2.2. KANABINOIDI	4
2.2.1. Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC).....	5
2.2.2. Kanabinol (CBN).....	5
2.2.3. Kanabidiol (CBD).....	6
2.2.4. Kanabigerol (CBG).....	6
2.2.5. Kanabikromen (CBC)	7
2.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST KANABINOIDA.....	7
2.4. METODE EKSTRAKCIJE	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Ekstrakti.....	13
3.1.2. Test mikroorganizmi.....	13
3.1.3. Hranjive podloge	14
3.1.4. Kemikalije.....	15
3.1.5. Uređaji.....	16
3.1.6. Pribor.....	16
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Priprema uzoraka	17
3.2.2. Priprema test mikroorganizama.....	17
3.2.3. Određivanje broja živih stanica	17
3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom	18
3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti u suspenziji bujona	19
3.2.6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČCI	30
6. POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Među vodećim izazovima farmaceutske industrije ističe se problem antibiotske rezistencije, posebice multirezistentnih bakterija. Pojavom antibiotika četrdesetih godina prošlog stoljeća, medicina je doživjela preokret. Otkriće i utvrđivanje mogućnosti korištenja prvog antibiotika, penicilina, otvorilo je vrata novom dobu medicine. U razdoblju od 50-ih do 70-ih godina prošlog stoljeća otkriveni su gotovo svi antibiotici koji se i danas koriste zbog čega se ovaj period naziva zlatnom erom antibiotika. Nakon otkrića antibiotika, isti su korišteni u velikim količinama, nerijetko bez prethodne provjere uzročnika bolesti. Ovakva praksa česta je i danas, koriste se antibiotici širokog spektra kako bi se bolesti suzbile u što kraćem vremenu s ciljem smanjenja opterećenosti bolničkog sustava.

Suprotno mišljenju liječnika 20. stoljeća, otkriće novih antimikrobnih tvari pokazalo se vrlo zahtjevnim te se i danas većinski koriste isti antibiotici koji su otkriveni tijekom zlatne ere. Modifikacijom poznatih molekula antibiotika pokušava se riješiti problem antibiotske rezistencije, međutim zbog sve većeg broja multirezistentnih patogena, znanstvenici su se okrenuli istraživanju novih izvora antimikrobnih djelatnih tvari, između ostalog i biološki aktivnim spojevima biljaka. Ispitivanjem svojstava eteričnih ulja brojnih biljaka uočena su antimikrobna, u nekim slučajevima i baktericidna djelovanja. Među biljkama koje privlače pažnju znanstvenika pronašla se i industrijska konoplja, latinskog naziva *Cannabis sativa*. Zbog svoje svestranosti uporabe, kako zbog čvrstih vlakana za proizvodnju užadi i tkanine, tako i zbog djelotvornog utjecaja na brojna fiziološka stanja, ova biljka znanstvenicima je poznata tisućljećima. Otkrićem psihoaktivnih tvari tijekom 20. stoljeća, djelomično je bila zanemarena od strane znanstvenika, međutim upravo problem antibiotske rezistencije vratio ju je u središte brojnih istraživanja.

Razvoj novih tehnologija ekstrakcije dodatno je potaknuo istraživanja mogućnosti iskorištavanja, kako eteričnog ulja, tako i drugih dijelova biljke. Ovim je radom ispitano antimikrobno djelovanje ekstrakata cvijeta industrijske konoplje koji su dobiveni trima različitim metodama ekstrakcije – klasičnom na magnetnoj miješalici, mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Karboksilirani i dekarboksilirani oblici ekstrakata ispitivani su na više test mikroorganizama uključujući bakterije mliječne kiseline, gram-pozitivne i gram-negativne bakterije te kvasce.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Industrijska konoplja

Zeljasta biljka iz porodice *Cannabaceae*, *Cannabis sativa L.*, može narasti i do šest metara u visinu, ovisno o kultivaru te okolišnim i agronomskim uvjetima uzgoja. Porijeklo je ove biljke teško definirati, ali smatra se da potiče iz područja Euroazije, odakle se proširila na istok prema Kini, ali i na zapad prema Europi. Prvotno je uzgajana kao važan izvor čvrstih vlakana za proizvodnju tkanine i užadi, no s vremenom pažnju je privuklo i njeno psihoaktivno djelovanje. Upravo je zbog toga, 1937. u SAD-u donesena odluka kojom je svaka kultivacija biljaka iz ove porodice pod direktnim nadzorom Ministarstva financija SAD-a te su uzgajati mogli samo licencirani i registrirani uzgajivači. Nekoliko godina poslije, 1942, kanabis je u potpunosti izbačen s liste službenih lijekova SAD-a (Amar, 2006).

Krajem 19. stoljeća nastojalo se razlikovati marihuanu od konoplje kako bi se omogućila daljnja kultivacija konoplje, prvenstveno za razvoj industrije zbog nezahtjevnih uvjeta uzgoja i prilagodljivosti različitim uvjetima. Međutim zbog velike morfološke sličnosti ovih kultivara, iste nije moguće razlikovati klasičnim analizama. Razvojem kemije i novih metoda analiza, 1976. godine određena je podjela po kojoj se industrijskom konopljom smatraju sojevi koji sadrže do 0,3 % THC u suhoj tvari cvijeta, a sve koncentracije veće od toga smatrane su marihuanom (Fike, 2016).

Kasnije je istraživanje Staginnusa i sur. (2014) pokazalo kako najprecizniji način razlikovanja uzima u obzir omjer kanabidiola i THC-a u suhoj tvari biljke. Ovaj je omjer konstantan tijekom cijele faze rasta i razvoja biljke, a ovisi o dva kodominantna alela – B_D i B_T . Kod homozigotnih kultivara genotipa B_D/B_D prevladava CBD u fenotipu, dok kod B_T/B_T prevladava THC.

Kemijski spojevi poput kanabinoida, terpena i fenola identificirani su u ekstraktima cvijeta industrijske konoplje. Terpeni, kao i kanabinoidi, sintetiziraju se u trihomima kanabisa te su odgovorni za karakterističan miris ovih biljaka. Trihomi su najviše koncentrirani na površini latica cvijeta. Sekretorni ili žljezdani trihomi izlučuju kanabinoide i druge spojeve u svrhu

obrane biljke od neželjenih nametnika dok neželjezdani služe kao fizička zaštita biljke (Happyana i sur., 2013).

Među spojevima koji se izlučuju u trihomima industrijske konoplje ističu se koncentracije psihoaktivne tvari Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) te sadržaj kanabidiola (CBD), spoja velikog medicinskog značaja. Uz navedene, industrijska konoplja sintetizira još tri glavna kanabinoida – kanabikromen, kanabigerol i kanabinol. Svih je pet navedenih kanabinoida pokazalo snažnu aktivnost u suzbijanju rasta brojnih sojeva meticilin rezistentnih bakterija *Staphylococcus aureus* – MRSA (Appendino i sur., 2008).

2.2. Kanabinoidi

Ovu skupinu spojeva čine fitokanabinoidi (prirodno izolirani spojevi biljke *Cannabis sativa*) i kemijski sintetizirani kanabinoidi. Dosad je poznato i izolirano 66 fitokanabinoida, biološki aktivnih terpenofenola, derivata 2-supstituiranog-5-amil rezorcinola. Prva zabilježena korištenja kanabisa datiraju još 2700 godina prije Krista kada su tadašnji kineski liječnici koristili pripravke kanabisa za liječenje malarije, reumatskih bolova, ali i za anesteziološke potrebe. Biološka je aktivnost ovih pripravaka privlačila i doktore na području Europe te je sredinom 19. stoljeća uporaba pripravaka konoplje doživjela svoj vrhunac. Po uzoru na iskustva doktora s područja Indije, William O'Shaughnessy, porijeklom iz Velike Britanije, utvrdio je analgetičke, antispazmatske i protuupalne karakteristike konoplje te utjecaj na povećanje apetita na temelju čega je odobrena medicinska uporaba tinkture i ekstrakta (Amar, 2006).

Tijekom druge polovice 19. stoljeća provedena su brojna istraživanja djelovanja pripravaka konoplje na razne bolesti te je proširena upotreba u liječenju. Međutim, zbog svojeg varirajućeg sastava ovisno o kvaliteti uzgoja i obrade biljke, psihoaktivnog utjecaja, ali i brojnih novo sintetiziranih lijekova, uporaba je značajno smanjena. Ubrzo su uslijedile i brojne zakonske regulative donesene upravo zbog psihoaktivnog djelovanja kanabisa kojima je dodatno ograničena uporaba, ali i samo istraživanje mogućnosti i medicinskog značaja bioaktivnih

komponentata ove biljke (Amar, 2006).

Velika prekretnica dogodila se otkrivanjem strukture prvog izoliranog kanabinoida, kanabinola (CBN), čija je struktura određena još davnih 1930-ih godina, a 1940. provedena je i kompletna sinteza ovog spoja što je ponovno potaknulo brojne znanstvenike na istraživanje mogućnosti uporabe metaboličkih produkata biljke *Cannabis sativa*, prvenstveno u medicinske svrhe. Tek su dva desetljeća kasnije, 1963., Mechoulam i suradnici izolirali i odredili strukturu kanabidiola. Već je sljedeće godine izoliran i THC, određena mu je struktura i sintetiziran je iz kanabidiola, a kasnije i iz jednostavnijih organskih tvari (Shevyrin i Morzherin, 2015) .

2.2.1. Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC)

Među najčešće istraživane molekule farmaceutske industrije zasigurno spada i THC. Ovaj se fitokanabinoid sintetizira u biljci ekspresijom alela kodominantnog s CBD-om. Način djelovanja THC-a može biti interakcijom s CB receptorima endokanabinoidnog sustava, ali može biti i neznan uz isti. Stimulacijom CB₁ receptora regulira apetit, raspoloženje, dok stimulacijom CB₂ utječe na bol i protuupalne procese. Među brojnim djelovanjima THC-a, ističe se protuupalno djelovanje, znatno jače i od aspirina, te antioksidacijska zaštita neuronskih stanica. Također, postoje indicije o mogućnosti korištenja THC-a kao bronhodilatatora u liječenju upala dišnih puteva te kao antipruritika kod liječenja kolestaze (žutice).

Prilikom transplantacije organa sisavaca, uočeno je pozitivno djelovanje THC-a na smanjenje komplikacija (Russo i Marcu, 2017).

2.2.2. Kanabinol (CBN)

Ovaj kanabinoid nastaje oksidacijom tetrahidrokanabinola (THC) te je njegova koncentracija u svježoj, zreloj biljci vrlo mala, ali tijekom skladištenja, posebice na višim temperaturama dolazi do porasta koncentracije zbog degradacije THC-a. U usporedbi s THC-om, kanabinol ima svega jednu četvrtinu jakosti djelovanja. Unatoč tome, tijekom istraživanja na životinjama, ali i ljudima, primijećena su brojna djelovanja ovog spoja. Od sedativnog i antikonvulzivnog, do značajnog protuupalnog i antibiotskog djelovanja, uključujući i antibiotsko djelovanje na meticilin rezistentni soj *Staphylococcus aureus* (MIC 11 µg/mL). Među brojnim potencijalima

kanabinola, ističe se topikalna uporaba u liječenju psorijaze i za tretiranje opekline. Također, istraživanja su pokazala mogućnost inhibicije aktivnosti brojnih enzima, uključujući ciklooksigenazu, lipoksigenazu i enzime iz skupine citokrom P450 te stimulaciju aktivnosti fosfolipaze (Russo i Marcu, 2017).

2.2.3. Kanabidiol (CBD)

Glavni predstavnici netoksičnih kanabinoida su kanabidiol (CBD) i kiselinski prekursor istog, kanabidiolna kiselina (CBDA). Osim što su netoksični, ovi su spojevi također i najzastupljeniji fitokanabinoidi u europskim sojevima industrijske konoplje. Iako CBD ima vrlo nizak afinitet prema CB receptorima endokanabinoidnog sustava, uočena je sposobnost antagonizma receptora CB₁ već pri malim koncentracijama uz prisutnost THC-a. Ovaj je antagonizam vjerojatno posljedica negativne alosteričke modulacije CB₁ receptora. Veliku pažnju privlače brojne farmakološke mogućnosti uporabe kanabidiola zbog antikonvulzivnih, protuupalnih, antioksidacijskih te antipsihotičnih djelovanja. Upravo se zahvaljujući navedenim djelovanjima, koristi u liječenju neuroloških i neurodegenerativnih poremećaja, uključujući epilepsiju, Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu i multiplu sklerozu te Huntingtonovu bolest. U kombinaciji s THC-om, kanabidiol suprimira toksično djelovanje samog THC-a, što rezultira smanjenim nuspojavama poput anksioznosti, tahikardije i gladi kod štakora i ljudi (Russo i Marcu, 2017).

2.2.4. Kanabigerol (CBG)

Kanabigerol je izoliran iz biljke kanabisa 1964., iste godine kada i THC, ali je vrlo brzo utvrđeno kako ne posjeduje psihotropne učinke (1969.). Kod prirodnih je kultivara koncentracija kanabigerola vrlo niska, no zahvaljujući brojnim istraživanjima, razvijeni su kultivari koji eksprimiraju kompletni sastav fitokanabinoida isključivo u obliku kanabigerola. Unatoč malom stimulirajućem djelovanju na CB₁ i CB₂ receptore, kanabigerol ima značajno stimulirajuće djelovanje na receptore za bol, upale te osjetljivost na toplinu. Uz to, ima antagonističko djelovanje na TRPM8 (receptor za hladnoću i mentol kod ljudi) što upućuje na mogućnost uporabe prilikom liječenja karcinoma prostate, prekomjerne aktivnosti detruzora (glatki mišić na unutarnjoj stijenci mokraćnog mjehura) te bolova mokraćnog mjehura. CBG

je također pokazao značajnija analgetska i antiaritmička djelovanja te izraženiju blokadu lipooksigenaze od THC-a, a znanstvenici su uočili i blaga antifungalna djelovanja u istraživanju 1978. godine (Elsohly i sur., 1978).

2.2.5. Kanabikromen (CBC)

Ovaj kanabinoid izoliran je 1966. godine na dva načina, ekstrakcijom pomoću heksan/florisil smjese otapala iz hašiša i benzenskom perkolacijom industrijske konoplje. Zbog vrlo male koncentracije u prirodnim sojevima industrijske konoplje, provedena su brojna križanja sojeva u svrhu ekspresije recesivnog gena, čime je dobiven soj bogat kanabikromenom. Za razliku od prethodno spomenutih kanabinoida, CBC nema značajan utjecaj na CB receptore te je mehanizam njegova djelovanja vezan uz druge kationske kanale živih organizama. CBC reagira sa TRP kationskim kanalima koji sudjeluju u procesima upale i imaju ulogu u javljanju boli zbog čega pojava smanjenja boli kod miševa uporabom CBC-a nije bila neočekivana. Mehanizam je djelovanja potvrđen 2012. godine kada su De Petrocelli i suradnici utvrdili stimulaciju TRPA1 kationskih kanala čime CBC smanjuje njihovu osjetljivost. Iste godine utvrđena je i desenzibilizacija TRPV4 i TRPV3 kationskih kanala što dodatno objašnjava utjecaj na upalne procese (Russo i Marcu, 2017).

2.3. Antimikrobna aktivnost kanabinoida

Antibakterijska svojstva ekstrakata konoplje uočena su još 1950-ih godina, no tada još nije bio definiran fitokemijski sastav biljke te se nije mogao odrediti spoj odgovoran za antimikrobnu aktivnost. Dva desetljeća kasnije, 1976., ispitivane su bakteriostatske i baktericidne aktivnosti Δ^9 -THC-a i CBD-a na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 te laboratorijske sojeve stafilokoka, streptokoka i enterobakterija. Utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije na gram-pozitivne patogene, ali nisu uočeni antimikrobni učinci na gram-negativne mikroorganizme korištene tijekom istraživanja (Klingeren i Ham, 1976).

Rezultati istraživanja Klingerena i Hama potvrđeni su kasnijim istraživanjima, među kojima

se ističe i jedno iz 2020. godine (Martinenghi i sur., 2020). Određene minimalne inhibitorne koncentracije kanabidiola (CBD) za *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300 iznosile su 1 µg/mL, dok je za iste kulture minimalna inhibitorna koncentracija kanabidiolne kiseline (CBDA) bila dvostruko veća.

S ciljem povećanja iskorištenja ekstrakcije, ispitivane su razne metode ekstrakcije, od klasičnog, hladnog prešanja i ekstrakcije pomoću otapala (metanol, vruća voda, petrolejski eter) do novijih tehnologija poput visokotlačne ekstrakcije i UAE metode (ultrazvučna ekstrakcija).

Iako je antimikrobna aktivnost čistih ekstrakata privlačila pozornost znanstvenika, neki od njih okrenuli su se ispitivanju mogućnosti eteričnih ulja različitih kultivara *Cannabis sativa*. Prilikom istraživanja koje su proveli Novak i sur. (2001) eterična su ulja pokazala vrlo slabu antimikrobnu aktivnost na većinu test mikroorganizama, a tek nešto značajniju na *Acinetobacter calcoaceticus* i *Brevibacterium linens*. Analiza je sastava spomenutih ulja utvrdila velike koncentracije α -pinena, mircena, trans- β -ocimena, α -terpinolena, trans-kariofilena i α -humulina, dok je koncentracija Δ^9 -THC-a i CBD-a bila tek u tragovima. Prema ovim rezultatima, antimikrobno djelovanje nije nužno posljedica prisutnosti kanabinoida.

Kasnije studije koje su analizirale ulje sjemenki, ekstrahirane u petrolejskom eteru i metanolu, potvrdile su prethodne tvrdnje Klingerena i Hama (1976), ali je uočena i blaga antimikrobna aktivnost na neke gram-negativne bakterije. Također, ekstrakti lišća dobiveni ekstrakcijom vrućom vodom i etanolom pokazali su inhibicijski učinak na rast gram-negativnih patogena (Karas i sur., 2020).

Novije istraživanje obuhvaćalo je fitokemijsku analizu 17 eteričnih ulja različitih kultivara industrijske konoplje (Iseppi i sur., 2019). Tijekom istraživanja je naglasak bio na pronalasku uzroka antimikrobne aktivnosti. Fitokemijskom je analizom identificiran 71 kemijski spoj među kojima su najzastupljeniji terpeni β -mircen, α -pinen, β -pinen, α -terpinolen, trans- β ocimen i limonen. Rezultati su pokazali blago antibakterijsko djelovanje ulja na više gram-pozitivnih bakterija te su određene minimalne inhibitorne koncentracije svakog od ulja. Usporedbom ovih rezultata s antimikrobnim djelovanjima čistih ekstrakata CBD-a i terpena, zamijećen je sinergistički učinak nekoliko biološki aktivnih komponenti eteričnog ulja.

Zanimljiv su pristup uporabi ekstrakata konoplje imali Nadir i sur. (2020). Ispitali su mogućnost uporabe terpena i kanabinoida iz biljke *C. sativa* u pročišćavanju vode. Imobilizirali su ove fitokemikalije na PES membrane (polietersulfonska membrana) što je uzrokovalo smanjenje veličine pora membrane za 5 % te je, zbog specifičnosti strukture kanabinoida i terpena, povećana hidrofilnost membrane u usporedbi s običnom PES membranom. Hibridna je membrana pokazala bolju retenciju i protok vode. Pored poboljšanja karakteristika same membrane, zabilježeno je i značajno smanjenje rasta gram-pozitivnih, ali i gram-negativnih bakterija na površini membrane. Ovo je istraživanje pokazalo kako se fitokemikalije industrijske konoplje, osim u farmaceutske i medicinske, mogu koristiti i u druge svrhe.

Ekstrakt listova biljke dobiveni klasičnom ekstrakcijom pomoću metanola pokazali su značajnu antifungalnu aktivnost prema *Aspergillus flavipes* (Khan i Javaid, 2020).

Analizom antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja *C. sativa* utvrđena je antifungalna aktivnost prema kvascima - *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* i *Candida parapsilosis* (Nafis i sur., 2019). Autori ovog istraživanja smatraju kako je ova antifungalna aktivnost vjerojatno posljedica značajne količine (E)-kariofilena, α -humulina i kariofilena u sastavu eteričnog ulja. Navedeni su test mikroorganizmi iz roda *Candida* korišteni i za ispitivanje sinergističkog učinka eteričnog ulja *C. sativa* i antibiotika flukonazola te je utvrđeno pojačano djelovanje u usporedbi s čistim antibiotikom.

Istraživanje Muscarà i sur. (2021) pokazalo je oprečne rezultate - dva standardizirana ekstrakta cvijeta *C. sativa* kineskog podrijetla (Δ^9 -THC < 0,2%), CChHE1 i CChHE2, nisu pokazala značajnu antifungalnu aktivnost prema *Candida albicans*, u usporedbi s antibiotikom kaspofungin. Također, ovi se ekstrakti nisu pokazali djelotvornima niti prema *Pseudomonas aeruginosa* ni *Escherichia coli* u provedenim uvjetima *in vitro* istraživanja. Nasuprot tome, oba su ekstrakta pokazala značajnu bakteriostatsku i bakteriocidnu aktivnost prema 19 kliničkih sojeva meticilin rezistentnog *S. aureus*.

2.4. Metode ekstrakcije

Ekstrakcijom se podrazumijeva potpuno ili djelomično odvajanje sastojaka smjese na temelju

različite topivosti u otapalu. Ova se tehnološka metoda može podijeliti na tri stupnja prijenosa mase. U prvom se stupnju željena komponenta iz uzorka otapa u otapalu, nakon čega slijedi odvajanje smjese otapala i otopljene tvari iz otopine te raspršivanje otopljene tvari u volumenu otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Tradicionalna metoda ekstrakcije podrazumijeva maceraciju, odnosno ekstrakciju željenih komponenta iz biljnog materijala pomoću otapala. Biljni se materijal usitnjava čime se povećava dodirna površina biljne tvari i otapala te se koriste otapala niske viskoznosti koja mogu bolje prodrijeti u masu tvari. Polarna otapala poput metanola, etanola i etil acetata koriste se za ekstrakciju hidrofilnih komponenti, dok se za lipofilne komponente koristi diklormetan ili smjesa diklormetana i metanola u omjeru 1:1 (Cos i sur., 2006).

Tehnološki je napredak omogućio razvoj novih metoda ekstrakcije - ekstrakcija mikrovalovima, ultrazvučna ekstrakcija, visokotlačna ekstrakcija (PLE, eng. *Pressurised liquid extraction*), ekstrakcija čvrstom fazom i ekstrakcija pomoću surfaktanata (Sasidharan i sur., 2010). Prednosti ovih metoda uključuju smanjenje uporabe otapala, što rezultira manjom proizvodnjom otpada i ubrzanjem procesa pročišćavanja. Osim toga, primjenom ovih metoda povećava se efikasnost ekstrakcije i automatizacija čitavog postupka.

Ekstrakcija pomoću etanola

Zbog velike dostupnosti i sigurnosti, najčešći izbor otapala za ekstrakciju tvari biljnog podrijetla je upravo etanol. Međutim, ono što ga čini pogodnim za uporabu je njegova polarnost koja omogućava značajnu topljivost terpena i fenola iz biljnog materijala (Hikmawanti i sur., 2021).

Ekstrakcija mikrovalovima

Iako se ova metoda koristi od sedamdesetih godina prošlog stoljeća, ekstrakcija mikrovalovima još se uvijek smatra novom tehnologijom čije mogućnosti uporabe nisu potpuno istražene. Prvotno je uporabljavana upravo u prehrambenoj industriji, a jedna je od velikih prednosti i mogućnost regulacije snage mikrovalova što čini ovu metodu pogodnom za ekstrakciju termolabilnih tvari (Blekić i sur., 2011). Princip ekstrakcije temelji se na

dielektričnom zagrijavanju svih molekula istovremeno. Mikrovalovi uzrokuju rotaciju dipola koji nastaju zbog oštećenja vodikovih veza, ali nemaju dovoljan energetska potencijal da bi uzrokovali promjene u strukturi molekula. Nastali ioni svojim kretanjem omogućuju veću izloženost matriksa otapalu čime se pospješuje ekstrakcija. Veliki utjecaj na ekstrakciju imaju veličina i raspodjela veličine čestica te otapalo koje se koristi tijekom ekstrakcije. Pogodnim otapalima smatraju se ona koja imaju veliku dielektričnu konstantu, ali i dobru topljivost ciljanih spojeva te je potrebno poznavati karakteristike oba čimbenika kako bi ekstrakcija bila visoko učinkovita. Obično se koriste dipolna otapala poput etanola, metanola i vode (Blekić i sur., 2011).

Ultrazvučna ekstrakcija

Metoda ekstrakcije temeljena na ultrazvučnim valovima koji prolaskom kroz ekstrakcijski medij uzrokuju akustičnu kavitaciju generirajući cikluse ekspanzije i dekompresije pri čemu nastaju mjehurići koji ekspandiraju i pucaju. Posljedica je navedenih djelovanja ultrazvučnih valova pucanje staničnih stijenki čime se oslobađa sadržaj stanice (Isidore i sur., 2021).

Velika je prednost uporabe ultrazvučnih valova ekonomska isplativost samog procesa te jednostavnost i brzina izvedbe. Uz to, ova metoda daje visoke prinose i može se provoditi s gotovo bilo kojim otapalom. Kao i svaka metoda, i ova ima neke negativne strane, od kojih se ističe utjecaj prirode matriksa biljnog uzorka na konačne prinose. Dispergirane faze u otopinama doprinose atenuaciji ultrazvučnih valova te isti ne prodiru daleko u medij, nego se većina zadržava u neposrednoj blizini zone emisije (Wang i Weller, 2006).

Ultrazvučna se metoda ekstrakcije smatra zelenom metodom jer omogućava korištenje ekološki prihvatljivijih otapala i smanjenje potrebne količine otapala (Fraterrigo i sur., 2021).

U istraživanju usporedbe ultrazvučne, mikrovalne ekstrakcije i konvencionalne metode ekstrakcije, mikrovalnom je metodom ekstrahirano znatno više neprerađenog ulja, ali je ukupna koncentracija polifenola u uzorcima dobivenim konvencionalnom i ultrazvučnom metodom bila gotovo ista (Kumar i sur., 2016).

Ultrazvučni valovi znatno brže uzrokuju razaranje staničnih stijenki i time ubrzavaju proces

ekstrakcije, bez utjecaja na kvalitetu dobivenih ekstrakata i strukturu ekstrahiranih molekula (Toma i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Disk difuzijskom metodom ispitivana su antimikrobna svojstva ekstrakata cvijeta industrijske konoplje te su pomoću resazurin boje određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Materijali i metode korištene za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti navedeni su u nastavku.

3.1. Materijali

Za potrebe određivanja antimikrobne aktivnosti ispitivanih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje korištene su otopine ekstrakata, test mikroorganizmi, hranjive podloge i drugi materijali navedeni u nastavku.

3.1.1. Ekstrakti

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišteni su karboksilirani (A) i dekarboksilirani (D) oblici ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobiveni ekstrakcijom mikrovalovima (M), ultrazvučnom ekstrakcijom (UZV) te kontrolni uzorak ekstrahiran metodom selektivnog otapala, u ovom slučaju etanola, na magnetnoj miješalici (K). Ekstrakti su pripremljeni u okviru projekta „Razvoj inovativnog postupka proizvodnje CBD ulja iz cvijeta industrijske konoplje i novih visokotehnoloških proizvoda - ekstrakata iz organskih poljoprivrednih sirovina“ u obliku praha/smole.

3.1.2. Test mikroorganizmi

Antimikrobna aktivnost ispitivana je na ukupno 13 test mikroorganizama, uključujući četiri gram-pozitivne i tri gram-negativne bakterije, tri vrste bakterija mliječne kiseline i tri kvasca. Navedeni test mikroorganizmi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasaca Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Čuvaju se kao trajne kulture u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na istom fakultetu.

U radu su korištene slijedeće mikrobne vrste:

- Gram-pozitivne-bakterije:
 - *Bacillus subtilis*
 - *Enterococcus faecalis*
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Staphylococcus aureus*
- Gram-negativne-bakterije:
 - *Escherichia coli*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Salmonella typhimurium*
- Bakterije mliječne kiseline:
 - *Lactobacillus kimchii*
 - *Lactobacillus plantarum*
 - *Leuconostoc mesenteroides*
- Kvasci:
 - *Candida albicans*
 - *Candida utilis*
 - *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.3. Hranjive podloge

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*) korištena je Mueller-Hinton hranjiva podloga (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) sastava:

- agar, 17,0 g/L
- hidroizolat kazeina, 17,5 g/L
- mesni ekstrakt, 2,0 g/L

Hranjive se podloge pripremaju prema uputama proizvođača, otapanjem navedene količine dehidrirane podloge u destiliranoj vodi, nakon čega slijedi sterilizacija u autoklavu pri 121 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon hlađenja na približno 55 °C, podloga se izlijeva u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavlja da se skrutne. Podloge se čuvaju u hladnjaku na +4 °C do upotrebe.

Tijekom ispitivanja antimikrobne aktivnosti, bakterije mliječne kiseline naciepljivane su na

MRS agar (De Man – Rogosa – Sharp; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) sastava:

- glukoza, 20 g/L
- mesni ekstrakt, 10 g/L
- hidroizolat kazeina, 10 g/L
- kvašćev ekstrakt, 10 g/L
- kalijev hidrogenfosfat 5 g/L
- amonijev citrat, 2 g/L
- natrijev citrat, 2 g/L
- $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L
- agar, 20 g/L

Hranjiva se podloga priprema prema uputama proizvođača – otapanjem odgovarajuće količine dehidrirane podloge u destiliranoj vodi, uz dodavanje otopine Tween 80 (1,0 mL otopine/L hranjive podloge), potom slijede isti postupci obrade kao i za gore navedenu podlogu.

Za naciepljivanje kultura kvasaca tijekom ispitivanja antimikrobne aktivnosti korištena je YPD (Yeast Peptone Dextrose) podloga sastava:

- glukoza 20 g/L
- pepton 10 g/L
- kvašćev ekstrakt 5g/L
- agar 20 g/L

Nakon otapanja navedenih sastojaka u demineraliziranoj vodi, slijede isti postupci obrade kao i za prethodno navedene hranjive podloge.

Za uzgoj svih navedenih test mikroorganizama korištene su tekuće podloge istog sastava, bez dodatka agara.

3.1.4. Kemikalije

Za potrebe ispitivanja antimikrobne aktivnosti navedenih ekstrakata korištene su kemikalije:

- čisti dimetilsulfoksid (DMSO, Lach-Ner, Hrvatska)

- sterilna destilirana voda
- destilirana voda
- antimikrobni disk papir (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka)
- antimikrobni disk papir s nistatinom, 100 U (Biolab Inc., Mađarska)
- antimikrobni disk papir s kanamicinom, 50 µg (Biolab Inc., Mađarska)
- natrijeva sol resazurina (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Njemačka)

3.1.5. Uređaji

Prilikom provođenja ispitivanja korišteni su uređaji:

- analitička vaga BP-210-S (Sartorius AG, Njemačka)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Njemačka)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec & Havočić, Hrvatska)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Hrvatska)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Hrvatska)

3.1.6. Pribor

Provođenje eksperimentalnog dijela ispitivanja zahtijevalo je uporabu slijedećeg pribora:

- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikroepuvete (2 mL)
- epruvete (5 mL)
- automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)
- Erlenmeyerove tikvice (500 mL, 1000 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- mikrobiološka ušica
- laboratorijske čaše
- menzure (250 mL, 500 mL, 1000 mL)
- plastična posuda za odlaganje otpada
- mikrotitarska pločica (96 jažica)

3.2. Metode

Za potrebe određivanja antimikrobne aktivnosti ispitivanih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje korištene su dolje navedene metode.

3.2.1. Priprema uzoraka

Za pripremu otopina ekstrakata korišten je dimetilsulfoksid (DMSO) koji zbog svoje polarnosti dobro otapa viskozne ekstrakte industrijske konoplje te ne inhibira rast test mikroorganizama. Ekstrakti cvijeta industrijske konoplje dobiveni prethodno navedenim metodama ekstrakcije, koncentrirani su te otopljeni u DMSO otapalu. Izvagana masa od 0,05 g viskoznog ekstrakta otopljena je u 5,0 mL DMSO kako bi se postigla koncentracija od 10 mg/mL.

3.2.2. Priprema test mikroorganizama

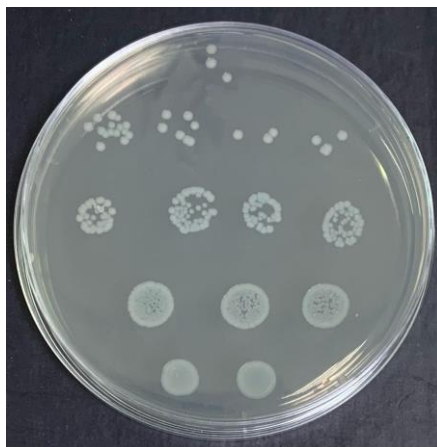
Kulture korištenih test mikroorganizama čuvaju se pri +4 °C nacijepljene na odgovarajućem kosom agaru, dok su u obliku trajnih kultura pohranjene pri -70 °C uz dodatak 50 % v/v glicerola. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljene su prekonoćne kulture nacijepljivanjem kultura test mikroorganizama (gram-pozitivne i gram-negativne bakterije i kvasci) u 10 mL odgovarajuće tekuće hranjive podloge (Mueller-Hinton bujon za gram-pozitivne i gram-negativne bakterije te YPD bujon za kvasce) pomoću mikrobiološke ušice. Revitalizirane kulture bakterija mliječne kiseline pripremljene su nacijepljivanjem 10 µL trajne kulture u 9,9 mL hranjivog MRS bujona.

Nacijepljivanje je provedeno u aseptičnim uvjetima te su kulture inkubirane u termostatima pri 37 °C (gram-pozitivne i gram-negativne bakterije) te 28 °C (bakterije mliječne kiseline i kvasci).

3.2.3. Određivanje broja živih stanica

Volumen od 100 µL uzorka prekonoćnih kultura razrijeđen je s 1,0 mL demineralizirane vode. Potom je je 100 µL ove suspenzije razrijeđeno s 5,0 mL demineralizirane vode. U svrhu utvrđivanja broja živih stanica u ovako razrijeđenim uzorcima prekonoćnih kultura, pripremljena su decimalna razrjeđenja istih u omjeru 1:10 (minimalno do šestog razrjeđenja ili više). Volumeni od 10 µL zadnjih pet razrjeđenja nacijepljeni su u obliku kapljica na odgovarajući hranjivi agar u Petrijevoj zdjelici te su nakon inkubacije prebrojane porasle

kolonije (slika 1). Broj živih stanica izražen je u obliku CFU vrijednosti (CFU, eng. *Colony Forming Units*) te je iznosio $\sim 10^6$ CFU/mL.



Slika 1. Određivanje ukupnog broja živih stanica na primjeru suspenzije *Staphylococcus aureus*. Nacijepljena razrjeđenja po redovima (paralele), od gore prema dolje: -6, -5, -4, -3 i -2 (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Disk difuzijska metoda vrsta je agar difuzijske metode (ADM), s obzirom da se provodi mjerenjem nastale zone inhibicije rasta u agaru (Horváth i sur., 2016).

Uzorak kulture stanica test mikroorganizama koncentracije $\sim 10^6$ CFU/mL nacijepljen je na ploču s agarom te su na njega stavljeni dijagnostički diskovi za izradu antibiograma. Na svaki disk je stavljeno 10 μ L uzorka ekstrakta koji se testira. Kao pozitivna kontrola korišten je standardizirani disk s antibiotikom kanamicinom za bakterije (50 μ g) i nistatinom za kvasce (100 U). Potom je uslijedila inkubacija pri 28 °C za kvasce i bakterije mliječne kiseline i 37 °C za ostale bakterije.

Porastom kultura, ukoliko uzorci ekstrakata imaju antimikrobnu aktivnost, oko diska nastaje zona inhibicije rasta, čiji promjer ovisi o jačini antimikrobne aktivnosti. Određivanjem promjera zone inhibicije rasta utvrđuje se antimikrobna jakost i osjetljivost test mikroorganizama te se oni dijele na osjetljive, umjereno osjetljive i rezistentne (Balouiri i sur., 2016).

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti u suspenziji bujona

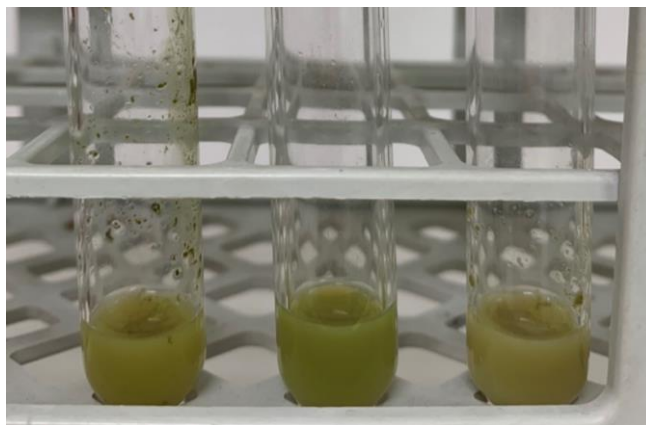
Otopina karboksiliranog ekstrakta (koncentracija 10 mg/mL) volumena 80 μ L dodana je u epruvetu s 1920 μ L Mueller-Hinton bujona. Potom je cjelokupan volumen kvantitativno prenesen u epruvetu s 2,0 mL Mueller-Hinton bujona naciepljenog s test mikroorganizmom u koncentraciji $\sim 10^6$ st/mL. Polazna koncentracija ekstrakta u svakoj epruveti iznosila je 0,2 mg/mL. Za svaki uzorak karboksiliranog ekstrakta pripremljene su dvije paralele. Istovremeno je pripremljena i slijepa proba bez dodanog ekstrakta kako bi se potvrdilo da je inhibicija uzrokovana testiranim uzorcima, a ne drugim čimbenicima (sastav hranjive podloge, uvjeti inkubacije, zdravstveno stanje kulture i dr.). Nakon 24 sata inkubacije, pripremljena su decimalna razrjeđenja te su ista naciepljena na ploče s agarom. Slijedila je ponovna inkubacija te je nakon 24 sata određena CFU vrijednost.

3.2.6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Uzorci ekstrakta koji su pokazali antimikrobnu aktivnost pri testiranoj koncentraciji (10 mg/mL) razrijeđeni su kako bi se odredila minimalna koncentracija ekstrakta koja još uzrokuje inhibiciju rasta.

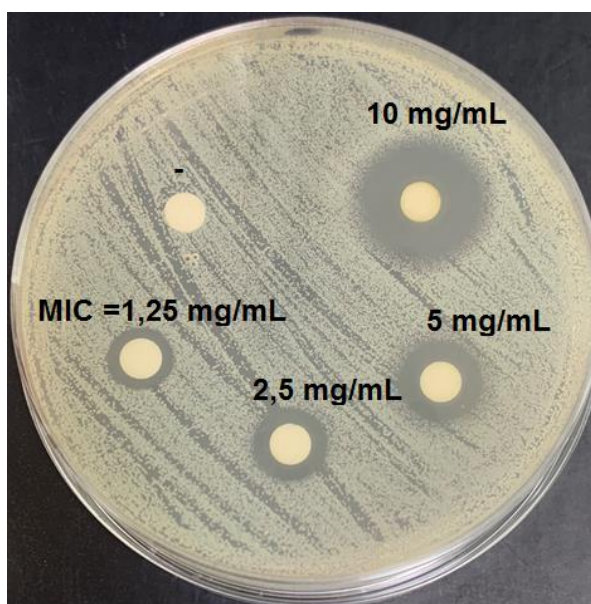
Danas je poznato nekoliko metoda za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije od kojih je prva razvijena metoda dilucije. Ovaj postupak podrazumijeva pripremu nekoliko dvostrukih razrjeđenja ispitivanog uzorka u hranjivoj podlozi u epruvetama minimalnog volumena 2,0 mL (makrodilucija) ili u jažicama mikrotitarske ploče volumena 200 μ L (mikrodilucija) (Balouiri i sur., 2016). Potom se naciepljuju kulture test mikroorganizama koncentracije $\sim 10^6$ i uslijedila je inkubacija 24 – 48h.

Najmanja koncentracija u kojoj se ne pojavi замуćenje, odnosno ne porastu stanice, smatra se minimalnom inhibitornom koncentracijom. Nakon inkubacije, određuje se porast stanica u svakom uzorku vizualno ili mjerenjem optičke gustoće. Navedena metoda nije prikladna za slučajeve kada se bujon zamuti dodatkom uzorka, što je bio slučaj s testiranim uzorcima u ovom radu (slika 2).



Slika 2. Otopine uzorka koncentracije veće od 10 µg/mL dodane u hranjivi bujon. Nastalo замуćenje i prisutne dispergirane čestice onemogućuju određivanje MIK metodom dilucije u bujonu (vlastita fotografija)

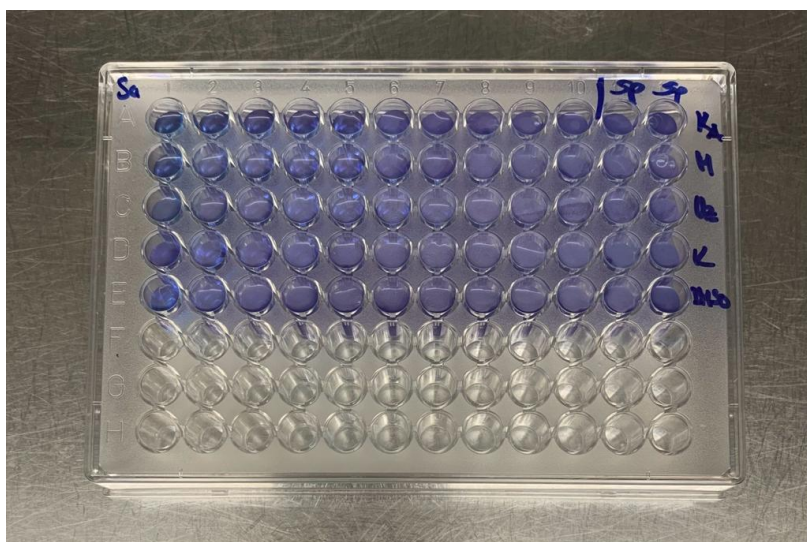
Metoda dilucije može biti provedena i na čvrstoj hranjivoj podlozi, odnosno ploči s agarom. U ovom slučaju, na isti način su pripremljena dvostruka razrjeđenja ekstrakta te je svako od razrjeđenja testirano disk difuzijskom metodom. Najmanja koncentracija koja je uzrokovala pojavu zone inhibicije rasta predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (slika 3). Prednost je ove metode mogućnost provedbe s uzorcima koji u bujonu stvaraju замуćenje te je zbog toga korištena i u ovom radu.



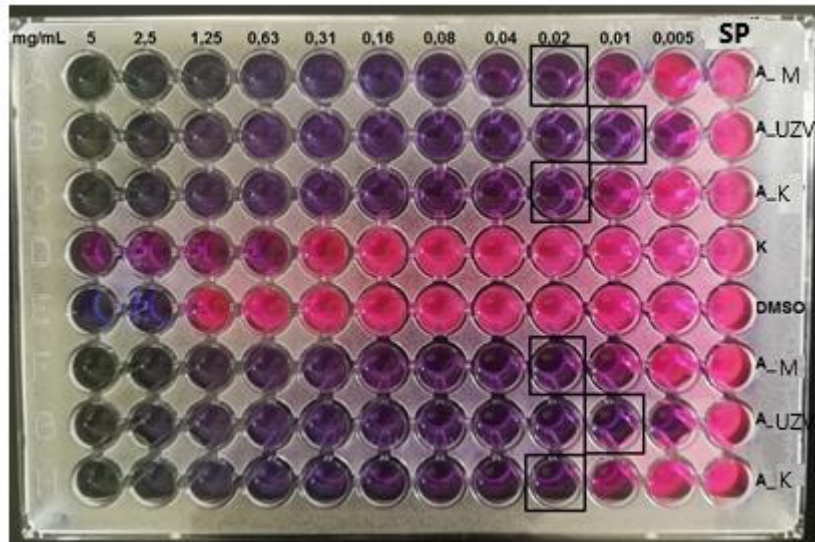
Slika 3. Princip određivanja minimalne inhibitorne koncentracije disk difuzijskom metodom (vlastita fotografija)

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije provodi se i mikrodilucijskom metodom pomoću boje resazurin. Metoda se temelji na sposobnosti živih stanica da reduciraju plavo-ljubičasti resazurin u rezorufin ružičaste boje (Elshikh i sur., 2016).

U jažicama mikrotitarske ploče pripremljena su dvostruka razrjeđenja ispitivanih ekstrakata u volumenu hranjivog medija i dvostruka razrjeđenja antibiotika kanamicina (50 µg) kao pozitivna kontrola za bakterije te slijepa proba i negativna kontrola. Slijepa proba sadržavala je samo hranjivi medij s naciepljenim kulturama, dok je negativna kontrola sadržavala i DMSO (dvostruka razrjeđenja u volumenu hranjivog medija, počevši od 50 %-tnog), odnosno otapalo u kojem su otopljeni uzorci ekstrakata. Svaka je od jažica naciepljena istim volumenom kulture stanica čime se ostvaruje početna koncentracija stanica od $\sim 10^6$ st/mL. Nakon 24 sata inkubacije, svakoj je jažici dodan jednak volumen (50 µL) 0,01 %-tne otopine boje (slika 4). Jažica s najmanjom koncentracijom ekstrakta u kojoj se boja nije reducirala i prešla u ružičastu, predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju tog ekstrakta (slika 5).



Slika 4. Određivanje MIK karboksiliranih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje za *S. aureus* pomoću resazurin boje – neposredno nakon dodavanja boje (vlastita fotografija)



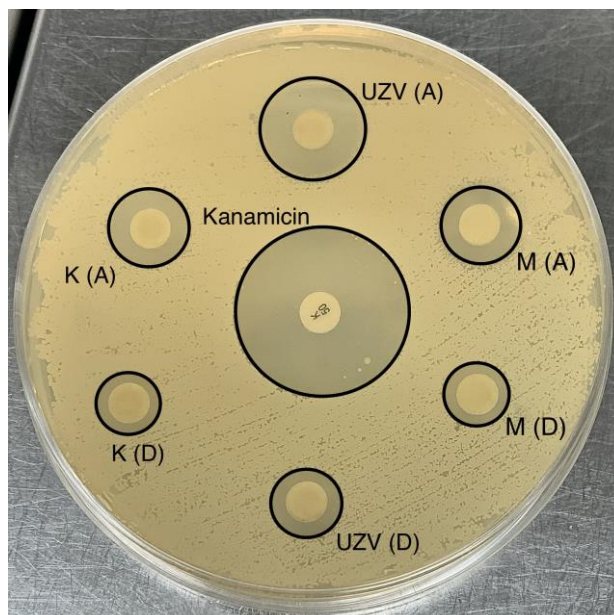
Slika 5. Određivanje MIK mikrodilucijom pomoću resazurin boje; plavo obojenje – inhibicija rasta, ružičasto obojenje – aktivne stanice *S. aureus* (vlastita fotografija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

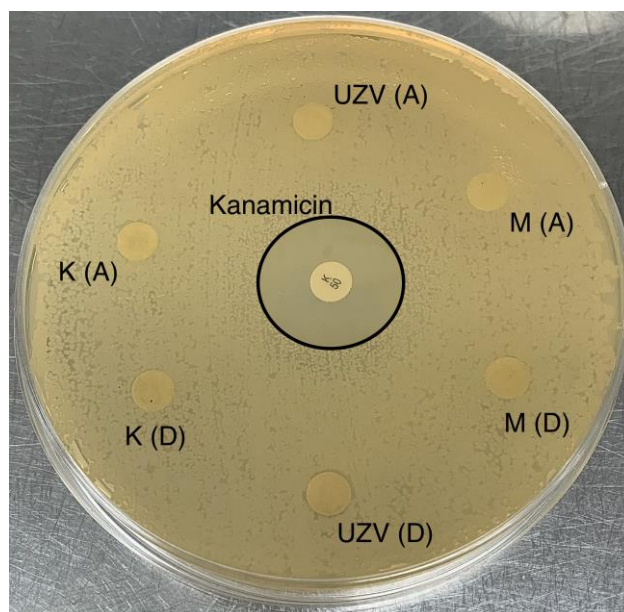
Određivanje antimikrobne aktivnosti karboksiliranih i dekarboksiliranih oblika ekstrakata cvijeta industrijske konoplje provedeno je disk difuzijskom metodom na ukupno 13 test mikroorganizama, 4 gram-pozitivne bakterije – *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*; 3 gram-negativne bakterije – *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Salmonella typhimurium*; 3 bakterije mliječne kiseline – *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* i 3 kvasca – *Candida albicans*, *Candida utilis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Za usporedbu antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišten je standardizirani disk s antibiotikom kanamicinom (50 µg) za bakterije te nistatinom (100 U) za kvasce. Rezultati disk difuzijske metode, iskazani kao zone inhibicije rasta (mm), prikazani su u tablici 1 te na slikama 6-8.

Tablica 1. Zone inhibicije rasta (mm) gram-pozitivnih bakterija nastale primjenom karboksiliranih (A) i dekarboksiliranih (D) ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Otopina ekstrakta [10 mg/mL]	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>
K (A)	12,5 ± 1,5	12 ± 0,0	11 ± 1,0	12 ± 0,0
UZV (A)	12,5 ± 0,5	15 ± 1,0	14 ± 0,0	17 ± 3,0
M (A)	10 ± 0,0	12,5 ± 1,5	11,5 ± 0,5	14 ± 2,0
K (D)	9,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	10,5 ± 1,5
UZV (D)	11 ± 1,0	11 ± 1,0	12 ± 1,0	11 ± 1,0
M (D)	8 ± 0,0	9,5 ± 1,5	10 ± 2,0	9,5 ± 0,5
POZITIVNA KONTROLA				
Kanamycin	11 ± 4,0	22 ± 1,0	20 ± 4,0	28 ± 2,0



Slika 6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti karboksiliranih (A) i dekarboksiliranih (D) ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), u koncentraciji 10 mg/mL, na *S. aureus* disk difuzijskom metodom, uz pozitivnu kontrolu - kanamicin (50 μ g)



Slika 7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti karboksiliranih (A) i dekarboksiliranih (D) ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), u koncentraciji 10 mg/mL, na *E. coli* disk difuzijskom metodom, uz pozitivnu kontrolu - kanamicin (50 μ g)

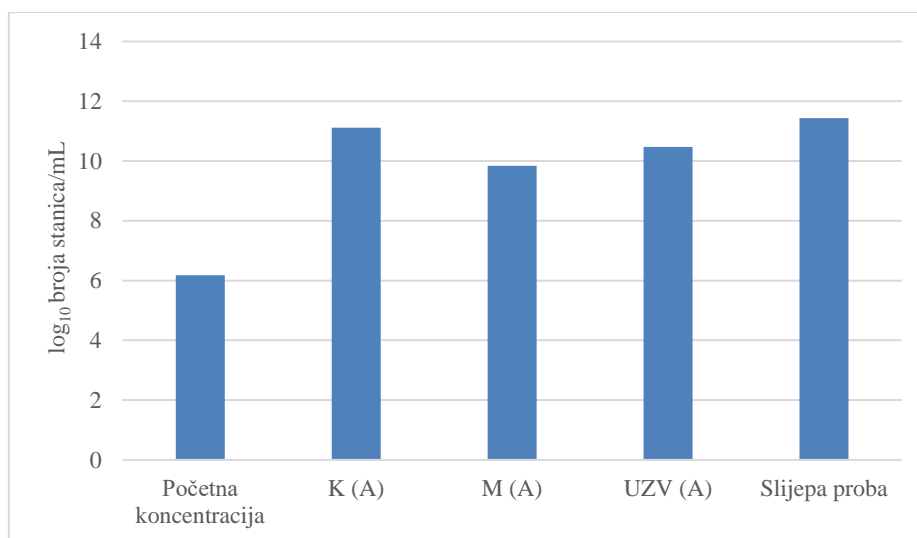
Od 13 korištenih test mikroorganizama, inhibiran je rast samo gram-pozitivnih bakterija s promjerima zona inhibicije rasta u rasponu 8-16 mm (tablica 1, slika 6). Nedostatak zona inhibicije rasta oko dijagnostičkih diskova upućuje na rezistenciju preostalih test mikroorganizama na korištene ekstrakte, među koje spadaju gram-negativne bakterije (primjer – *E. coli*, slika 7), bakterije mliječne kiseline i kvasci.

Ekstrakti kanabinoide pokazuju antimikrobnu aktivnost prema meticilin rezistentnim sojevima *S. aureus* (MRSA) djelovanjem CBG-a na citoplazmatsku membranu stanice gram-pozitivnih bakterija, dok je za inhibiciju rasta gram-negativnih bakterija potrebna prethodna permeabilizacija vanjske membrane (Farha i sur., 2020). Ove tvrdnje Farha i suradnika objašnjavaju antimikrobnu aktivnost ispitivanih ekstrakata ovog rada na gram-pozitivne bakterije i nedostatak iste na gram-negativne bakterije i bakterije mliječne kiseline.

Prethodno provedeno istraživanje Muscarà i sur. (2021) nije utvrdilo antimikrobnu aktivnost niti jednog od dva korištena standardizirana ekstrakta industrijske konoplje na kvasac *Candida albicans*. Uzevši to u obzir, kao i činjenicu da nema puno istraživanja koja potvrđuju antifungalnu aktivnost ekstrakata industrijske konoplje, nedostatak antifungalne aktivnosti ispitivanih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje ide u prilog dosadašnjim rezultatima u navedenom području.

Nadalje, kako navode Ali i sur. (2012), osjetljivima se smatraju test mikroorganizmi kod kojih su prosječni promjeri zone inhibicije veći od 15 mm, umjereno osjetljivima kulture s prosječnim promjerom 14-15 mm, a sve kulture s prosječnim promjerima zone inhibicije manjim od 14 mm smatraju se rezistentnima. Uzevši u obzir navedene promjere, umjereno osjetljivima prema karboksiliranim ultrazvučnim ekstraktima mogu se klasificirati *L. monocytogenes*, *E. faecalis* i *S. aureus*, dok je prema karboksiliranom ekstraktu dobivenom mikrovalnom ekstrakcijom umjerenu osjetljivost pokazala samo bakterija *S. aureus* (tablica 1). Preostale su zone inhibicije rasta manjeg promjera od 14 mm što upućuje na slabu antimikrobnu aktivnost preostalih ekstrakata (u koncentraciji od 10 mg/mL) na navedene gram-pozitivne bakterije.

Ograničena sposobnost inhibicije rasta ispitivanih ekstrakata prikazana je na slici 8. Nakon 24 sata inkubacije *S. aureus* u suspenziji u koju je dodan karboksilirani ekstrakt u koncentraciji od 0,2 mg/mL, vidljiv je značajan porast broja stanica.



Slika 8. Broj stanica na početku uzgoja i nakon 24 sata inkubacije bakterije *S. aureus*, poraslih bez ekstrakta (slijepa proba) i u prisustvu karboksiliranih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) dodanih u koncentraciji od 0,2 mg/mL

Karboksilirani ekstrakti cvijeta industrijske konoplje uzrokovali su značajniju inhibiciju rasta gram-pozitivnih bakterija u usporedbi s dekarboksiliranima, što potvrđuju promjeri zona inhibicije rasta navedeni u tablici 1. Ipak, svi su ekstrakti pokazali slabiju antimikrobnu aktivnost (pri koncentraciji 10 mg/mL) od korištenih standarda antibiotika kanamicina (50 µg), što je vidljivo u tablici 1.

Ovakav rezultat nije u skladu s rezultatima istraživanja Farha i sur. (2020). Rezultati tog istraživanja su pokazali značajniju inhibicijsku aktivnost dekarboksiliranih oblika (CBD, CBG i THC) od njihovih karboksiliranih prekursora (CBDA, CBGA i THCA) prema gram-pozitivnim bakterijama.

Uspoređujući metode ekstrakcije, u tablici 1 vidljive su značajnije inhibicijske zone rasta uzrokovane ultrazvučnim ekstraktima, kako karboksiliranima, tako i dekarboksiliranima. Značajnija antimikrobna aktivnost upućuje na bolju ekstrakciju inhibitornih bioaktivnih metabolita cvijeta industrijske konoplje. Ovakav ishod u skladu je s prethodnim usporedbama mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih komponenata biljnog materijala koje

potvrđuju veću efikasnost ultrazvučne ekstrakcije u usporedbi s mikrovalnom (Silva Júnior i sur., 2021; Barrera Vázquez i sur., 2014). Dodatno, usporedba ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije kanabinoida i terpena industrijske konoplje koju su proveli Addo i sur. (2022) potvrđuje veću efikasnost ekstrakcije ovih metabolita ultrazvučnim valovima.

Ekstrakti koji su pokazali antimikrobnu aktivnost primjenom disk difuzijske metode, ponovo su ispitivani s istim gram-pozitivnim bakterijama, ali su pripremljena dvostruka razrjeđenja, počevši od 10 mg/mL (razrjeđenje korišteno u prvom dijelu analize) kako bi se odredila najmanja koncentracija koja pokazuje antimikrobnu aktivnost (tablice 2 i 3). Minimalne inhibitorne koncentracije za *E. faecalis* i *L. monocytogenes* određene su disk difuzijskom metodom, dok su za *B. subtilis* i *S. aureus* određene metodom mikrodilucije pomoću resazurin boje.

Tablica 2. Promjeri zona inhibicije rasta (mm) *B. subtilis* i *L. monocytogenes* nastali prilikom određivanja MIK karboksiliranih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje, dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), disk difuzijskom metodom

Koncentracije karboksiliranih uzoraka	<i>E. faecalis</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
	K (A) [mm]	M (A) [mm]	UZV (A) [mm]	K (A) [mm]	M (A) [mm]	UZV (A) [mm]
10 mg/mL	11	13	14	13	16	16
5 mg/mL	10	9	13	11	11	12
2,5 mg/mL	-	9	12	10	8	10
1,25 mg/mL	10	-	10	8	-	9
0,625 mg/mL	-	-	-	-	-	8

Tablica 3. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) karboksiliranih ekstrakata cvijeta industrijske konoplje dobivenih različitim metodama ekstrakcije (K – klasična, UZV – ultrazvučna, M – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) za *B. subtilis* i *S. aureus*, određena mikrodilucijskom metodom pomoću resazurin boje

Ispitivani uzorak	Minimalna inhibitorna koncentracija [mg/mL]	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
K (A)	0,50	0,062
UZV (A)	0,25	0,015
M (A)	0,50	0,062
Kanamycin [$\mu\text{g/mL}$]	0,625	0,625
DMSO (%)	12,5	25

Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) prikazani u tablici 2 prikazuju značajniju antimikrobnu aktivnost ekstrakata dobivenih klasičnom i ultrazvučnom metodom u usporedbi s mikrovalnim ekstraktima. Najviše se ističe MIK ultrazvučnog karboksiliranog ekstrakta za *L. monocytogenes* (tablica 2).

Isto tako, MIK ultrazvučnih ekstrakata za *B. subtilis* i *S. aureus*, određene mikrodilucijskom metodom, značajno su manje u usporedbi s MIK mikrovalnog i kontrolnog ekstrakta za iste bakterije (tablica 3).

Minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih ekstrakata prikazane u tablici 3, značajno su veće u usporedbi sa standardnim antibiotikom kanamicinom.

U istraživanju Schofs i sur. (2021), određena je MIK metanolnih ekstrakata listova industrijske konoplje za *B. subtilis* iznosila 1560 $\mu\text{g/mL}$, znatno više od MIK korištenih ekstrakata u ovom radu za istu bakteriju (tablica 3).

Ali i sur. (2012), istraživanjem antimikrobne sposobnosti metanolnih ekstrakata cijele biljke industrijske konoplje, odredili su minimalne inhibitorne koncentracije u iznosu od 50 $\mu\text{g/mL}$ za *S. aureus* što je približno rezultatima MIK za *S. aureus* mikrovalnog i kontrolnog ekstrakta prikazanim u tablici 3, značajnije je odstupanje jedino ultrazvučnog ekstrakta s MIK u iznosu

15,6 µg/mL.

Usporedbom prethodno opisanih rezultata s prijašnjim istraživanjima može se zaključiti kako je za postizanje značajnije inhibicije rasta potrebno optimizirati način dobivanja i pročišćavanja ispitivanih ekstrakata. Primjerice, u istraživanju Blaskovich i sur. (2021) minimalna je inhibitorna koncentracija ekstrakta CBD-a za *S. aureus* iznosila svega 1-2 µg/mL što je istovjetno rezultatima i prethodno navedenog istraživanja Martinenghi i sur. (2020).

5. ZAKLJUČCI

1. Analizirani uzorci ekstrakata cvijeta industrijske konoplje, *Cannabis sativa*, pokazali su ograničenu antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, i *S. aureus*, od kojih je najveću osjetljivost pokazala bakterija *S. aureus*.
2. Ispitivani ekstrakti cvijeta industrijske konoplje u koncentraciji od 10 mg/mL nisu inhibirali rast testiranih gram-negativnih bakterija, bakterija mliječne kiseline ni kvasaca.
3. Karboksilirani ekstrakti cvijeta industrijske konoplje pokazali su značajniju inhibicijsku aktivnost u usporedbi s dekarboksiliranim oblicima ispitivanih ekstrakata.
4. S obzirom da je najznačajnija inhibicija uzrokovana korištenjem ultrazvučnog ekstrakta, može se zaključiti kako je ekstrakcija ultrazvučnim valovima učinkovitija za ekstrakciju bioaktivnih metabolita cvijeta industrijske konoplje u usporedbi s tradicionalnom i mikrovalnom ekstrakcijom.
5. Iako rezultati ovog rada potvrđuju antimikrobni potencijal ekstrakata cvijeta industrijske konoplje, usporedba rezultata analize s literaturnim podacima upućuje na potrebu optimizacije načina dobivanja navedenih ekstrakata u svrhu postizanja značajnije antimikrobne aktivnosti.

6. POPIS LITERATURE

Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA (2012) Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chin Med* **03**, 61–64. <https://doi.org/10.4236/cm.2012.31010>.

Amar MB (2006) Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* **105**, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.001>.

Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M i sur., (2008) Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure–activity study. *J Nat Prod* **71**, 1427–1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>.

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

Barrera Vázquez MF, Comini LR, Martini RE, Núñez M, Bottini S, Cabrera JL (2014) Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*). *Ultrason sonochem* **21**, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.023>.

Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliot AG, Zhang B, Ramu S, Amado M i sur. (2021) The antimicrobial potential of cannabidiol. *Commun Biol* **4**, 7. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01530-y>.

Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 32–47.

Cos P, Viletinck A J, Berghe D V, Maes L (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept”. *J Ethnopharmacol* **106**, 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>.

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2**, 22–33.

Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R i sur. (2016) Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory

concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett* **38**, 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.

Elsohly MA, Turner CE, Phoebe CH, Knapp JE, Schiff PL, Slatkin DJ (1978) Anhydrocannabisativine, a new alkaloid from *Cannabis sativa* L. *J Pharm Sci* **67**, 124. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670135>.

Farha MA, El-Halfawy OM, Gale RT, MacNair CR, Carfrae LA, Zhan X i sur. (2020) Uncovering the hidden antibiotic potential of cannabis. *ACS Infect Dis* **6**, 338–346. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00419>.

Fike J (2016) Industrial Hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Crit Rev Plant Sci* **35**, 406–424. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1257842>.

Fraterrigo Garofalo S, Tommasi T, Fino D (2021) A short review of green extraction technologies for rice bran oil. *Biomass Convers Bioref* **11**, 569–587. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00846-3>.

Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, Van Dam A, Schneider B, Kayser O (2013) Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LC-MS and cryogenic NMR. *Phytochemistry* **87**, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.001>.

Hikmawanti ENP, Fatmawati S, Asri AW (2021) The Effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) leaves extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **755**, 012060. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012060>.

Horváth G, Bencsik T, Ács K, Kocsis B (2016) Antibiotic resistance. *Elsevier*, str. 239–269.

Iseppi R, Brighenti V, Licata M, Lambertini A, Sabia C, Messi P i sur. (2019) Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (Hemp). *Molecules* **24**, 2302. <https://doi.org/10.3390/molecules24122302>.

Isidore E, Karim H, Ioannou I (2021) Extraction of phenolic compounds and terpenes from *Cannabis sativa* L. by-products: from conventional to intensified processes. *Antioxidants* **10**,

942. <https://doi.org/10.3390/antiox10060942>.

Karas JA, Wong LJM, Paulin OKA, Mazeh AC, Hussein MH, Li J i sur. (2020) The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics* **9**, 406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070406>.

Khan IH, Javaid A (2020) Antifungal activity of leaf extract of *Cannabis sativa* against *Aspergillus flavipes*. *J Weed Sci Res* **27**, 447–453. <https://doi.org/10.28941/pjwsr.v26i4.883>.

Klingeren B, Ham M (1976) Antibacterial activity of A9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie van Leeuwenhoek* **42**, 9–12. <https://doi.org/10.1007/BF00399444>.

Kumar P, Yadav D, Kumar P, Panesar PS, Bunkar DS, Mishra D i sur. (2016) Comparative study on conventional, ultrasonication and microwave assisted extraction of γ -oryzanol from rice bran. *J Food Sci Technol* **53**, 2047–2053. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2175-2>.

Martinenghi LD, Jenssen H, Jönsson R, Lund T (2020) Isolation, purification, and antimicrobial characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules* **10**, 900. <https://doi.org/10.3390/biom10060900>.

Muscarà C, Smeriglio A, Trombetta D, Mandalari G, La Camera E, Occhiuto C i sur. (2021) Antioxidant and antimicrobial activity of two standardized extracts from a new Chinese accession of non-psychoactive *Cannabis sativa* L. *Phytother Res* **35**, 1099–1112. <https://doi.org/10.1002/ptr.6891>.

Nadir I, Rana NF, Ahmad NM, Tanweer T, Batool A, Taimoor Z i sur. (2020) Cannabinoids and terpenes as an antibacterial and antibiofouling promoter for PES water filtration membranes. *Molecules* **25**, 691. <https://doi.org/10.3390/molecules25030691>.

Nafis A, Kasrati A, Jamali CA, Mezrioui N, Setzer W, Abbad A i sur. (2019) Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. *Ind Crops Prod* **137**, 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.032>.

Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz CM (2001) Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J* **16**, 259–262. <https://doi.org/10.1002/ffj.993>.

Russo EB, Marcu J (2017) Cannabis pharmacology: The usual suspects and a few promising leads. *Adv Pharmacol* **80**, 67-134. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>.

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram K, Latha L (2010) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **8**, 1–10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>.

Schofs L, Sparo MD, Sánchez Bruni SF (2021) The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacol Res Perspect* **9** e00761. <https://doi.org/10.1002/prp2.761>.

Shevyrin VA, Morzherin YY (2015) Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russ Chem Bull* **64**, 1249–1266. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1008-1>.

Silva Júnior ME, Araújo MVRL, Santana AA, Silva FLH, Maciel MIS (2021) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. *Arab J Chem* **14**, 103260. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103260>.

Staginnus C, Zörntlein S, De Meijer E (2014) A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *J Forensic Sci* **59**, 919–926. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12448>.

Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem* **8**, 137–142. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(00\)00033-x](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(00)00033-x).

Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* **17**, 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>.

Wiredu Addo PW, Sagili SUKR, Bilodeau SE, Glau-Gallant FA, MacKenzie DA, Bates J i sur. (2022) Microwave- and ultrasound-assisted extraction of cannabinoids and terpenes from cannabis using response surface methodology. *Molecules* **27**, 8803. <https://doi.org/10.3390/molecules27248803>.

Izjava o izvornosti

Ja, Klara Rončević, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis