

# Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz rogača (*Ceratonia siliqua*), mirte (*Myrtus communis*) i tršlje (*Pistacia lentiscus*) primjenom ultrazvuka

---

Kolanović, David

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:681559>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**David Kolanović**

7313/PT

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ ROGAČA (*Ceratonia  
siliqua*), MIRTE (*Myrtus communis*) I TRŠLJE (*Pistacia lentiscus*)  
PRIMJENOM ULTRAZVUKA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ – KK.01.1.1.04.0093, koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020.

**Mentor:** *doc. dr. sc. Zoran Zorić*

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz rogača (*Ceratonia siliqua*), mirte (*Myrtus communis*) i tršlje (*Pistacia lentiscus*) primjenom ultrazvuka**

***David Kolanović, 0058209244***

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je odrediti masene udjele fenolnih spojeva i pigmenata te antioksidacijski kapacitet u etil-acetatnim, acetonskim i etanolnim ekstraktima dobivenih iz plodova rogača, listova i plodova mirte i listova tršlje ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom. Ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli i pigmenti određeni su spektrofotometrijski dok je antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom. Najveći prinos određen je u acetonskoj frakciji u svim uzorcima, a visok antioksidacijski kapacitet pokazali su ekstrakti svih biljaka osim ekstrakta rogača.

**Ključne riječi:** antioksidacijski kapacitet, bioaktivni spojevi, fenolni spojevi, flavonoidi, ultrazvučna ekstrakcija

**Rad sadrži:** 32 stranice, 11 slika, 4 tablice, 57 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:** *doc. dr. sc. Zoran Zorić*

**Pomoć pri izradi:** *Patricija Lisica, mag. ing.*

**Datum obrane:** 15. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

**Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from the carob (*Ceratonia siliqua*), the myrtle (*Myrtus communis*) and the lentisk (*Pistacia lentiscus*)**

***David Kolanović, 0058209244***

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate phenolic content and to determine antioxidant capacity in obtained ethyl acetate, ethanol and acetone extracts from dry ground samples of carob pod, myrtle leaves and berries and mastic leaves using ultrasound-assisted extraction. Total phenolics, flavonoids, hydroxycinnamate acids, flavonols and pigments (chlorophylls and carotenoids) were analysed by spectrophotometric methods and antioxidant capacity by the ORAC method, respectively. The highest yield of total phenolic compounds was determined in the acetone fraction in all samples while the high antioxidant capacity was determined in extracts of all plants except carob pod.

**Keywords:** antioxidant capacity, bioactive compounds, flavonoids, phenolic compounds, ultrasound-assisted extraction

**Thesis contains:** 32 pages, 11 figures, 4 tables, 57 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Zoran Zorić, Assistant Professor*

**Technical support and assistance:** *Patricija Lisica, BSc Research Assistant*

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. FENOLNI SPOJEVI</b> .....	2
<b>2.2. BILJNI PIGMENTI: KLOROFILI I KAROTENOIDI</b> .....	3
<b>2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI ROGAČA (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)</b> .....	4
<b>2.4. BIOAKTIVNI SPOJEVI MIRTE (<i>Myrtus communis</i> L.)</b> .....	5
<b>2.5. BIOAKTIVNI SPOJEVI TRŠLJE (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)</b> .....	6
<b>2.6. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET</b> .....	7
<b>2.7. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA</b> .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	10
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	10
<b>3.1.1. Uzorci mediteranskog bilja</b> .....	10
<b>3.1.2. Kemikalije</b> .....	10
<b>3.1.3. Aparatura</b> .....	12
<b>3.1.4. Pribor</b> .....	12
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	13
<b>3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva uz primjenu ultrazvuka</b> .....	13
<b>3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari</b> .....	14
<b>3.2.3. Određivanje ukupnih fenola</b> .....	15
<b>3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida</b> .....	16
<b>3.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola</b> .....	17
<b>3.2.6. Određivanje biljnih pigmenata (klorofila i karotenoida)</b> .....	20
<b>3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom</b> .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	22
<b>4.1. UKUPNA SUHA TVAR</b> .....	22
<b>4.2. UKUPNI FENOLI, FLAVONOIDI, FLAVONOLI I HIDROKSICIMETNE KISELINE</b> .....	23
<b>4.3. BILJNI PIGMENTI (KLOROFILI I KAROTENOIDI)</b> .....	24
<b>4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET – ORAC METODA</b> .....	25
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	27
<b>6. LITERATURA</b> .....	28

# 1.UVOD

Bioaktivni spojevi začinskog, aromatskog, ljekovitog i medicinskog bilja vrlo su zanimljivi u znanosti. Mogu djelovati kao antioksidansi i na taj način suzbiti opasne slobodne radikale koji uzrokuju oštećenja stanica te u konačnici mnogobrojne bolesti. Osim toga, imaju sposobnost djelovanja kao mikrobiocida i konzervanasa.

Mediterransko bilje poput rogača, mirte i tršlje bogat je izvor bioaktivnih spojeva od kojih glavno mjesto zauzimaju različiti fenolni spojevi. Za izolaciju ovih spojeva iz biljnog matriksa, od davnina pa sve do danas se koriste različite metode ekstrakcije. S napretkom tehnologije, razvile su se i nove tehnike ekstrakcije kao što je to ekstrakcija primjenom ultrazvuka koja je korištena u ovom radu.

Prednosti inovativnih tehnika ekstrakcije su manja štetnost za okoliš zbog smanjene potrošnje kemikalija, skraćeno je vrijeme ekstrakcije, povećana je efikasnost ekstrakcije i veće su uštede energije.

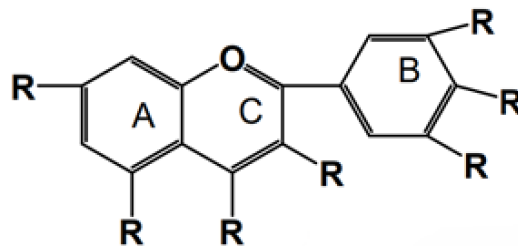
Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na prinose fenolnih spojeva (masene udjele ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) te pigmenata (klorofila a i b) izoliranih iz osušenih i usitnjenih plodova rogača, listova i plodova mirte te listova tršlje. Provedena je sukcesivna ekstrakcija primjenom otapala rastuće polarosti (heksan, 80% aceton te 96% etanol) pri temperaturi od 65 °C i vremenu trajanja od 30 minuta. U svim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet primjenom ORAC metode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi široka su skupina sekundarnih biljnih metabolita koje karakterizira prisutnost hidroksilne skupine (-OH) direktno vezane na aromatski ili benzenski prsten. Ukoliko ovi spojevi sadrže dvije ili više hidroksilnih skupina, tada se govori o polifenolima. U biljnom carstvu fenolni spojevi predstavljaju najbrojniju i najraznolikiju skupinu spojeva, s trenutno više od 8000 poznatih kemijskih struktura. Fenolni spojevi sveprisutni su u svim biljnim organima i zbog toga su sastavni dio ljudske prehrane (Bravo, 1998; Kabera i sur., 2014; Tungmunnithum i sur., 2018).

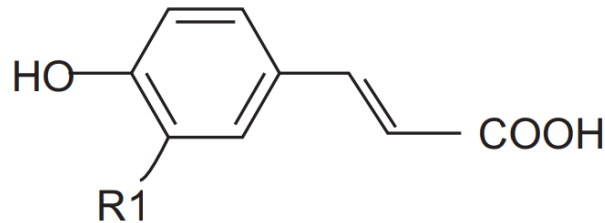
Zbog velikog broja fenolnih spojeva, njihova terminologija i klasifikacija je kompleksna. Iako svi fenolni spojevi imaju sličnu kemijsku strukturu, postoje neke karakteristične razlike na temelju kojih se mogu podijeliti u dvije skupine: flavonoidi i neflavonoidi. Temeljna struktura flavonoida sastoji se od dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 1). Ovi spojevi u biljkama imaju mnoštvo funkcija, mogu primjerice djelovati kao fiziološki regulatori, kemijski glasnici, cvjetni pigmenti, inhibitori staničnog ciklusa, UV filteri (Kabera i sur., 2014).



**Slika 1.** Osnovna kemijska struktura flavonoida (Kabera i sur., 2014)

Flavonoidi se dijele u šest skupina: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoli, flavanoni i antocijanidini. Flavonoli su najraširenija skupina flavonoida prisutna u ljudskoj prehrani, a flavonoidi se mogu međusobno povezivati i umrežavati čineći oligomere i polimere koji se zovu tanini. Tanini su podijeljeni u dvije skupine: hidrolizirani i kondenzirani tanini. Neflavonoidi se dijele na fenolne kiseline, lignane i stilbene, dok se fenolne kiseline dijele u dvije osnovne

skupine: derivati hidroksicimetne kiseline (Slika 2) i derivati hidroksibenzojeve kiseline (Celep i sur., 2014).



**Slika 2.** Osnovna kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Celep i sur., 2014)

Polifenoli u ljudskoj prehrani igraju važnu ulogu u prevenciji bolesti. Visok unos voća, povrća i cjelovitih žitarica povezan je sa smanjenim rizikom brojnih kroničnih bolesti uključujući kardiovaskularne bolesti, kronične upale, rak i mnoge degenerativne bolesti (Scalbert i sur., 2005; Sharma, 2014). Uzrok tome je bogatstvo tih namirnica polifenolima. Dokazano je da polifenoli pokazuju antioksidativnu aktivnost te da u voću više pridonose cjelokupnoj antioksidativnoj aktivnosti nego vitamin C (Sharma, 2014). Studije su pokazale da su mnoge bolesti uzrokovane ili povezane sa oksidativnim stresom koji potiče od reaktivnih dušikovih i kisikovih vrsta. Polifenoli kao jaki antioksidansi mogu neutralizirati slobodne radikale (koji se formiraju u bolesti) i to na način da im doniraju vodikov atom ili elektron. Oni sprječavaju stvaranje slobodnih radikala, čime smanjuju stopu oksidacije i to na način da deaktiviraju aktivne kisikove vrste i prekursore slobodnih radikala (Rice-Evans i sur., 1996; Wang i sur., 1996; Marrugat i sur., 2004; Scalbert i sur., 2005; Sharma, 2014).

## **2.2. BILJNI PIGMENTI: KLOROFILI I KAROTENOIDI**

Biljni pigmenti naširoko su prisutni u prirodi. Ovisno o svojoj kemijskoj strukturi klasificiraju se u sljedeće grupe:

- ❖ Tetrapiroli
- ❖ Karotenoidi
- ❖ Polifenolni spojevi
- ❖ Alkaloidi

Navedeni pigmenti intenzivno se koriste u medicini, prehrambenoj i tekstilnoj industriji te drugim granama industrije. U novije vrijeme biljni pigmenti se intenzivnije istražuju zbog njihove uloge u prehrani, preradi, kvaliteti, sigurnosti te pakiranju hrane. Biološka upotreba



ovih pigmenta može pomoći u prevenciji oksidativnih ozljeda stanice uzrokovanih reaktivnim dušikovim i kisikovim vrstama (Aguirre-Joya i sur., 2020).

Tetrapiroli su obilna skupina biljnih pigmenta odgovorna za raznolike esencijalne biokemijske funkcije poznate u većine živih organizama. Ovi spojevi imaju ključnu ulogu u biljnim procesima disanja, asimilacije sumpora i dušika te fotosinteze (Tanaka i sur., 2011).

Biljke proizvode 4 vrste tetrapirola: fitokrom, hem, sirohem i klorofil. Najveća skupina tetrapirola u prirodi su klorofili, koji daju biljkama zelenu boju. Klorofili djeluju kao fotosintetski pigmenti, hvatajući svjetlosnu energiju i prenoseći ju u reakcijsko središte kako bi se izazvala sinteza organskih spojeva nužnih za biljku. Najčešći izooblici u fotosintetskom tkivu biljaka su klorofili *a* i *b*, gdje se nalaze u omjeru 3:1. Locirani su u biljnim organelima kloroplastima te zajedno sa fitolnim grupama lipida i porfirinskim grupama proteina čine kristalne sferične konglomerate u stanicama (Aguirre-Joya i sur., 2020).

Karotenoidi su jedna od glavnih grupa biljnih pigmenta prisutnih u prirodi s oko 600 identificiranih kemijskih struktura. Široko su rasprostranjeni u sjemenkama, cvijeću, voću i povrću s bojama u rasponu od žute, preko narančaste pa sve do intenzivno crvene. Pripadaju skupini tetraterpena i pošto apsorbiraju svjetlo u vidljivom dijelu spektra, igraju bitnu ulogu u fotosintezi i apsorpciji svjetla sprječavajući fotooksidaciju osnovnih spojeva biljke. U prirodi se nalaze u obliku karotena kao što su to primjerice  $\beta$ -karoten i likopen koji imaju lančastu ugljikovodičnu strukturu te u obliku ksantofila – oksigeniranih derivata karotena. Neki predstavnici ksantofila su lutein, zeaksantin, neoksantin, violaksantin. Dok su ksantofili najprisutniji karotenoidi u prirodi, karoteni su najvažniji karotenoidi za prehrambenu industriju (Botella-Pavía i Rodríguez-Concepción, 2006).

### **2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI ROGAČA (*Ceratonia siliqua* L.)**



**Slika 3.** Zrela mahuna rogača sa sjemenkama (Mulet i sur., 2015)

Rogač (*Ceratonia siliqua* L.) je zimzeleno stablo koje se pretežno uzgaja u mediteranskom području. Dio biljke koji se najviše koristi je plod rogača (Slika 3) koji je u suštini mahuna koja je kad je zrela dugačka 10-25 cm te se sastoji od 90% pulpe i 10% sjemenki.

Mahune rogača sadrže: visoke količine ugljikohidrata (40-60%), dijetalna vlakna (27-50%) polifenolne spojeve, posebice tanine (18-20%), male količine proteina (3-4%) i lipida (0,4-0,8%), minerale (natrij, kalij, bakar, cink, mangan, željezo), visok udio šećera od kojih su najzastupljeniji saharoza (32-38%), fruktoza (5-7%) i glukoza (5-6%) mada njihov sadržaj može varirati (Marakis, 1996; Rtibi i sur., 2017).

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u mahunama rogača provedena je u više istraživanja HPLC metodom čiji su rezultati pokazali prisutnost sljedećih polifenola: kondenzirani tanini (proantocijanidini) građeni od flavan-3-olnih grupa i njihovih galoilnih estera, kvercetin glikozidi, galna kiselina, (+)-katehin, (-)-epigalokatehingalat, (-)-epikatehingalat, hidrolizirani tanini (elagitanini, galotanini) (Avallone i sur., 1997; Corsi i sur., 2002; Papagiannopoulos i sur., 2004; Ortega i sur., 2009).

Rezultati istraživanja koje su proveli Owen i sur. (2003) su pokazali da su u mahuni rogača najzastupljeniji flavonoidi (26%), hidroksitirozol, tanini, flavon glikozidi (kao što je kvercetin-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozid) i fenolne kiseline (kao što su galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, cinaminska kiselina).

#### **2.4. BIOAKTIVNI SPOJEVI MIRTE (*Myrtus communis* L.)**

Mirta (*Myrtus communis* L.) je zimzeleni grm koji raste diljem Mediterana, često kao dio makije. Cvate od lipnja do srpnja bijelim cvjetovima, a plod su joj jestive plave bobice (Slika 4).

Taamalli i sur. (2013) kategorizirali su bioaktivne spojeve lista mirte u 7 skupina: galna kiselina i galoilni derivati, elaginska kiselina i derivati, heksahidroksidifenolilni derivati, flavonoidi, lignani, galomirtukumuloni i ostali spojevi. Posljednju grupu ostalih spojeva čine organske kiseline i karotenoidi gdje se ističe karotenoid glikozid neoremaniozid.

Bobice mirte sadrže fenolne kiseline, flavanole, flavonole i flavonol glikozide. Glavni sastojci bobica mirte su flavonol miricetin i derivati glikozida. Iz grupe flavonol glikozida glavni spoj prisutan je miricetin-3-O-arabinozid. Glavni spoj prisutan iz grupe flavanola je (-)-epigalokatehin. Fenolne kiseline prisutne su u niskoj koncentraciji a glavne prisutne kiseline su galna, elaginska i kafeinska kiselina (Barboni i sur., 2010).



**Slika 4.** Plod i list mirte (Messaoud i sur., 2011)

## **2.5. BIOAKTIVNI SPOJEVI TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)**

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je zimzeleni grm (Slika 5) ili stablo rasprostranjeno na području Mediterana koje se već dugo koristi u ljudskoj prehrani, farmaceutskoj industriji i tradicionalnoj medicini. Uspijeva na različitim tipovima tla i može podnositi i akumulirati sol pri visokim koncentracijama, a dobro podnosi i visoke temperature i sunčevo zračenje (Barrato i sur., 2003; Landau i sur., 2014; Azib i sur., 2019).

Dvije najvažnije klase bioaktivnih spojeva u tršlji su fenoli i terpeni. Iako su obe skupine spojeva prisutne u svim dijelovima biljke, terpeni su koncentrirani u smoli biljke te u esencijalnim uljima dobivenim destilacijom vodenom parom smole ili nasjeckanih listića. U lišću su koncentrirani fenoli (Landau i sur., 2014).



**Slika 5.** Listovi i plod tršlje (Landau i sur., 2014)

Polifenoli tršlje razvrstavaju se u 3 kategorije: flavonol glikozidi, galoilni derivati (hidrolizirani tanini) i antocijanini. Dok udio i vrsta fenolnih spojeva varira ovisno o nekim faktorima kao što su geografsko područje, vrijeme berbe, svjetlosna gustoća, čini se da su neki spojevi sveprisutni u lišću tršlje kao što su to katehin i galna kiselina (Romani i sur., 2002).

## **2.6. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET**

Gutteridge (1994) je definirao antioksidans kao bilo koju tvar koja kada je prisutna u relativno niskoj koncentraciji u odnosu na oksidirajući supstrat, znatno inhibira ili odgađa oksidaciju tog supstrata. Reaktivne kisikove vrste kao što su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kisik ( $O_2^1\Delta g$ ), peroksilni radikal ( $ROO\bullet$ ), alkoksilni radikal ( $RO\bullet$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ) i superoksidni anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) mogu napadati biološke makromolekule uzrokujući oštećenja na DNA, proteinima i lipidima što za posljedicu može imati starenje stanica, rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Antioksidansi suzbijaju ili čiste produkte respiracije reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, uključujući slobodne radikale (Halliwell i Guterridge, 1989).

Antioksidacijski kapacitet je sposobnost kemijskih spojeva da zaštite biološke sustave protiv potencijalno štetnih efekata kemijskih reakcija ili procesa koji uključuju reaktivne kisikove i dušikove vrste. U posljednje vrijeme molekule antioksidanasa zadobile su visoku reputaciju kao ključne zaštitne molekule iznimno bitne za ljudski organizam u smislu sprječavanja nepoželjnih procesa i bolesti. Ove molekule vrlo su zanimljive u medicini, nutricionizmu, biologiji i agrokemijskim područjima što je dovelo do potrebe za potražnju jednostavnih, pogodnih i pouzdanih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Potraga za

prirodnim antoksidansima koji bi mogli spriječiti degenerativne bolesti privukla je istraživače koji tvrde da bi se takve bolesti mogle prevenirati adekvatnim unosom antioksidansa. Ekstrakti biljaka pokazali su prisutnost brojnih sekundarnih metabolita sa antioksidativnom aktivnošću pa je i povećan interes za identifikaciju takvih spojeva iz biljaka (Rojas i Buitrago, 2019).

Postoje različite metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, a prema tipu reakcije dijele se u dvije grupe:

- ❖ HAT (Hydrogen Atom Transfer) metode – prijenos atoma vodika, u koje spadaju: ABTS/TEAC, DPPH, FCR, FRAP i CUPRAC metoda
- ❖ ET (Electron Transfer) metode – prijenos elektrona, u koje spadaju: TRAP i ORAC metoda

U ovom radu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta korištena je ORAC metoda. Ova metoda kao inicijator koristi neki *bis-azid* kao što je kemijski spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropionamid)-dihidroklorid) kako bi stvorio peroksilne radikale kada je sustav zagrijan u prisutnosti dovoljno kisika. Peroksilni radikali zatim reagiraju s fluorescentnim uzorkom kako bi suzbili njegovu fluorescenciju. Smanjenje fluorescencije prati se optički, a antioksidacijska aktivnost određena je usporavanjem pada fluorescencije u prisutnosti antioksidansa. Antioksidacijski kapacitet određen ovom metodom mjeri se u  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv.}$  gdje TE označava trolox ekvivalent. Trolox je kemijski spoj koji u ovoj metodi služi kao standard i za izradu baždarnog pravca (Apak i sur., 2013).

## **2.7. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA**

Ekstrakcija je tretman biljnog ili životinjskog tkiva kroz standardne postupke sa selektivnim otapalima u svrhu otapanja farmaceutski aktivnih sastojaka, dok većina inertne tvari ostaje neotopljena. Ekstrakcija bioaktivnih kemijskih spojeva prvi korak je u analizi aromatičnog bilja i ona igra ključnu ulogu u njihovoj daljnoj separaciji i karakterizaciji. Danas je dostupan širok raspon ekstrakcijskih tehnika, od konvencionalne ekstrakcije pa sve do inovativnih postupaka (Manousi i sur., 2019).

Ultrazvuk je posebni tip zvučnog vala koji može stvoriti kompresiju i ekspanziju kada prolazi kroz tekućinu ili tekućinu koja sadrži krute materijale (Azmir i sur., 2013). Ultrazvučni valovi koji se koriste u kemiji obično imaju frekvenciju između 20 kHz i 100 MHz i takav ultrazvuk zove se ultrazvuk visokog intenziteta. Kada se koriste ultrazvučni valovi događa se fenomen kavitacije, koji uključuje stvaranje, rast i puknuće mjehurića. Mehanički efekt ovog procesa je ubrzanje otpuštanja organskih spojeva sadržanih unutar stanica tkiva koje se tretira te

ubrzanje prijenosa mase. Rezultat je lakša ekstrakcija staničnog materijala pomoću otapala koje se koristi. Postoje dva osnovna načina ultrazvučne ekstrakcije: direktna – pomoću ultrazvučnog sustava sonde te indirektna – pomoću ultrazvučne kupelji.

Kada se govori o ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog tkiva, efikasnost ultrazvučne ekstrakcije veća je nego kod konvencionalne ekstrakcije. U usporedbi s tehnikama kao što je mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija koristi jeftiniju opremu koja je lakša za upotrebu. U globalu može se reći da ekstrakcija primjenom ultrazvuka štedi energiju, učinkovita je, brza i selektivna tehnika, koja se može koristiti za termolabilne spojeve jer ne zahtijeva upotrebu visoke temperature (Azmir i sur., 2013; Shams i sur., 2015).

Ipak, ova tehnika može imati i neželjene efekte. Kada se koristi energija ultrazvuka, poznato je da ona povremeno može štetno djelovati na bioaktivne sastojke začinskog i aromatskog bilja. Kao rezultat toga može se dogoditi formiranje slobodnih radikala koji mogu uzrokovati nepoželjne promjene na molekulama (Handa i sur., 2008).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci mediteranskog bilja

U ovom istraživanju korišteni su suhi usitnjeni uzorci mediteranskog bilja s hrvatskih otoka. Biljke i dijelovi biljaka korišteni u istraživanju su: zrele mahune rogača (*Ceratonia siliqua* L.), listovi i bobice mirte (*Myrtus communis* L.) te listovi tršlje (*Pistacia lentiscus* L.).

#### 3.1.2. Kemikalije

- ❖ Heksan
- ❖ Etil-acetat
- ❖ Aceton, 80%-tni
- ❖ Etanol, 96%-tni
- ❖ Metanol, 100 %-tni
- ❖ Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- ❖ Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)  
*Priprema:* 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- ❖ Standard galne kiseline  
*Priprema:* Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- ❖ Aluminijev klorid, 10%-tni  
*Priprema:* 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid–heksahidrat,p.a.) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- ❖ Kalijev acetat, 1 M  
*Priprema:* 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- ❖ Standard kvercetina (100 mg/L)  
*Priprema:* Odvaži se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni

metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrjeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

- ❖ Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%-tna
- ❖ Klorovodična otopina masene koncentracije 1g/L HCl (u 96% etanolu)  
*Priprema:* 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.
- ❖ Klorovodična otopina masene koncentracije 2g/L HCl  
*Priprema:* 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- ❖ Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)  
*Priprema:* Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.
- ❖ Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)  
*Priprema:* Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.
- ❖ Fosfatni pufer (75 mM, pH 7,0)  
*Priprema:* Odvaži se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) i otopi u 200 mL destilirane vode te se u istoj količini vode otopi i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). U tikvici od 200 mL pomiješa se 61 mL 0,2 M otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 39 mL 0,2 M otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- ❖ Otopina standarda – Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)  
*Priprema:* Početna ("stock") otopina trolox, početne koncentracije 103,99  $\mu\text{M}$  se pripravi otapanjem 2,6 mg trolox u 100 mL 75 mM fosfatnog pufera. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja (3,12 – 103,99  $\mu\text{M}$ ).
- ❖ AAPH (240 mM) (2,2'-azobis(2-amidinopropionamid)-dihidroklorid)



*Priprema:* Otopi se 0,651 g AAPH u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens.

❖ Fluorescein (70,3 nM)

• Otopina 1

*Priprema:* Otopi se 22,5 mg fluoresceina u 50 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0).

• Otopina 2

*Priprema:* Od otopine 1 se uzme 24,5  $\mu$ L te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0). Svaki dan se pripravljaju svježa razrjeđenja otopina fluoresceina.

### 3.1.3. Aparatura

- ❖ Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- ❖ Ultrazvučna kupelj (Elmasonic S 40H, Elma, Njemačka)
- ❖ Centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- ❖ Rotacijski uparivač (RV 10, IKA, Njemačka)
- ❖ Laboratorijski sušionik (FN 500, Nuve, Turska)
- ❖ Eksikator
- ❖ Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- ❖ Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)

### 3.1.4. Pribor

- ❖ Plastične lađice za vaganje
- ❖ Falcon epruvete, volumena 25 mL
- ❖ Odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 1L
- ❖ Stakleni lijevak
- ❖ Filter papir
- ❖ Aluminijske posudice
- ❖ Stakleni štapići
- ❖ Staklene kivete
- ❖ Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- ❖ Automatske mikropipete volumena 1-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L
- ❖ Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- ❖ Staklene epruvete

- ❖ Staklene čaše
- ❖ Eppendorf epruvete volumena 2,5 mL
- ❖ Mikrotitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva uz primjenu ultrazvuka**

Upotreba ultrazvuka pri procesu ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala temelji se na fenomenu kavitacije. Ovaj fenomen zaslužan je za široku upotrebu ove metode čiji je princip razbijanje stanične stijenke stanica biljaka uz otpuštanje ciljnih spojeva iz njihovih prirodnih sredina. U usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, ultrazvučna ekstrakcija poboljšava kvalitetu ekstrakata te uvelike smanjuje vrijeme ekstrakcije, troškove i volumene otapala (González de Peredo i sur., 2019).

#### **Postupak sukcesivne ekstrakcije:**

U Falcon epruvete od 25 mL odvaže se 2,5 g ( $\pm 0,1$  g) uzorka suhog usitnjenog mediteranskog bilja te se falcon epruvete napune heksanom do 2/3 volumena. Ekstrakcija se provodi u ultrazvučnoj kupelji na temperaturi od 65 °C u trajanju od 30 minuta. Zatim slijedi centrifugiranje u trajanju 15 min pri 4000 okretaja po minuti. Centrifugiranjem se odvoji talog od supernatanta koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL. Dalje se supernatant uparava do suha na rotacijskom uparivaču (Slika 6), nakon čega se otopi u 50 mL etil-acetata, čime je dobivena prva frakcija ekstrakata. Talog se prebaci u falcon epruvete u koje se doda 80%-tni aceton do 2/3 volumena te ponovi postupak ekstrakcije i centrifugiranja. Supernatant se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te se nadopuni 80%-tnim acetonom do oznake čime se dobije druga frakcija ekstrakata. Isti postupak s talogom se ponovi uz 96%-tni etanol nakon čega se dobije treća frakcija ekstrakata. Ekstrakti se skladište na +4 °C do daljnje analize.

Iz dobivenih ekstrakata, odnosno iz prve, druge i treće frakcije određuju se ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli, antioksidacijski kapacitet hidrofилnih i lipofilnih sastojaka te pigmenti (klorofili i karotenoidi).



**Slika 6.** Rotacijski uparivač (vlastita fotografija)

### **3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari**

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Svaka sirovina se sastoji od dijela vode i suhe tvari. U suhoj tvari sadržani su svi oni parametri koji čine prehrambenu vrijednost neke namirnice. Određivanjem ukupne suhe tvari proizvoda (topljive i netopljive) sušenjem na 105 °C određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984).

#### **Priprema uzorka:**

Početne uzorke potrebno je prije samog mjerenja homogenizirati.

#### **Postupak određivanja:**

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko dva sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću  $\pm 0,0002$  g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 2 ml ekstrakta (kod određivanja ukupne suhe tvari ekstrakta) i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od  $\pm 0,0002$  g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik, prethodno zagrijan na  $105\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  te se zagrijava jedan sat sa zaklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od pola sata, ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću  $\pm 0,0002$ g.

### **Izračun:**

Ukupna suha tvar izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{ukupna suha tvar}(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

gdje je:

$m_0$  – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g),

$m_1$  – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g),

$m_2$  – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

### **3.2.3. Određivanje ukupnih fenola**

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etil-acetatnom/acetonskom/etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

#### **Postupak određivanja:**

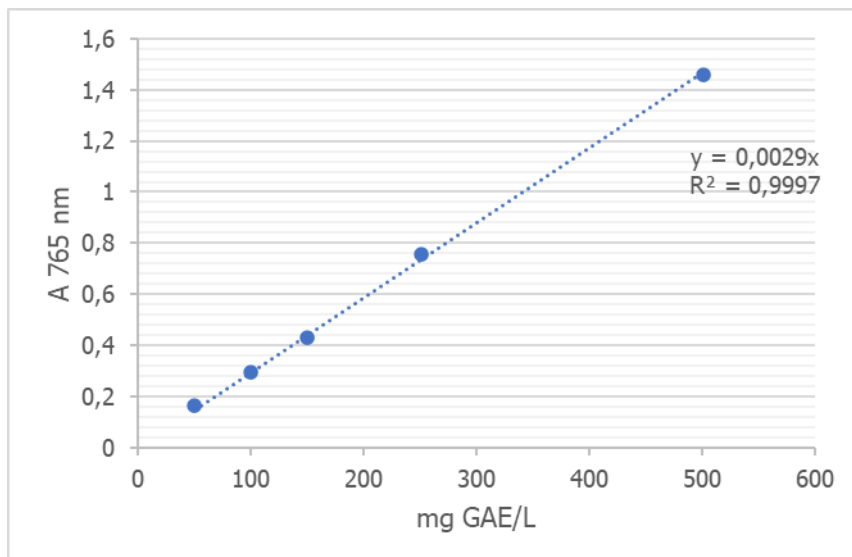
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta, 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $t=50$  °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

#### **Izrada baždarnog pravca:**

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $t=50$  °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100  $\mu$ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtan je baždarni pravac (Slika 7) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene masene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 7.** Baždarni dijagram za ukupne fenole

### 3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etil-acetatnom/acetonskom/etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

#### **Postupak određivanja:**

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10%-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

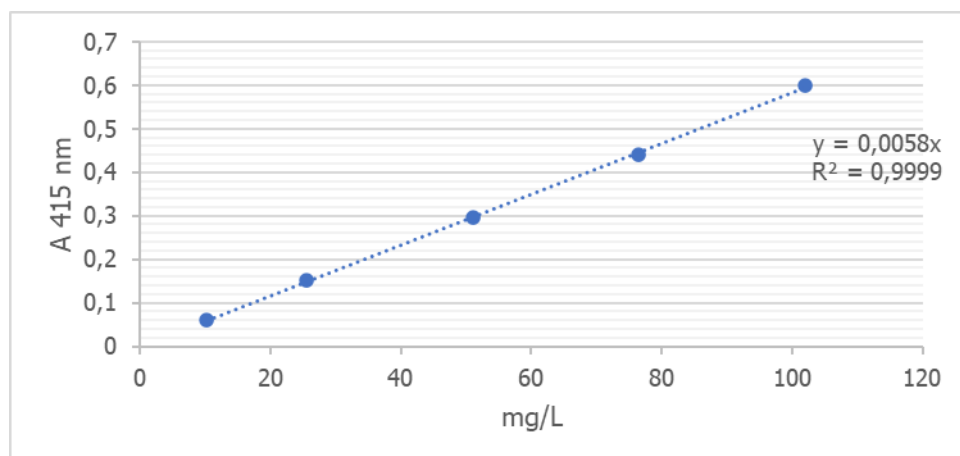
#### **Izrada baždarnog pravca:**

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se

nadopunjavaju do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa potom stoji 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac (Slika 8) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 510 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 8.** Baždarni dijagram za ukupne flavonoide

### 3.2.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje se provodi u etil-acetatnom/acetonskom/etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

#### **Postupak određivanja:**

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L ekstrakta, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

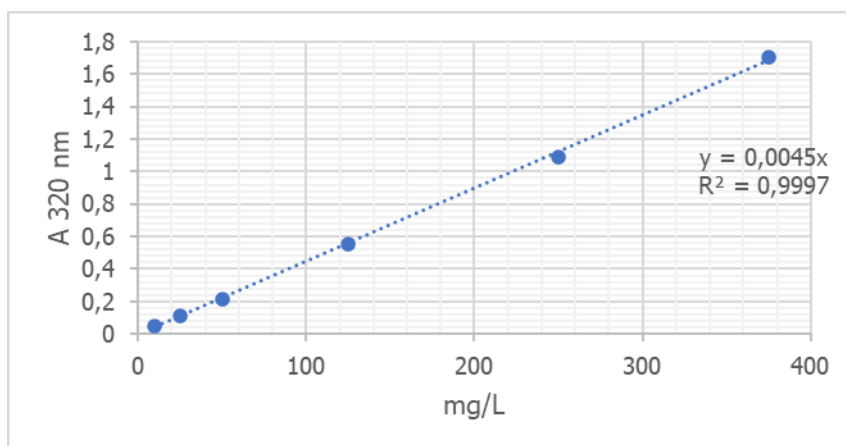
### **Izrada baždarnog pravca:**

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu (Slika 9) te jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu (Slika 10) dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin (Slika 11).

#### **a) Kafeinska kiselina**

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 9.23, 23.99, 49.82, 99.63, 147.60, 228.78 mg/L.

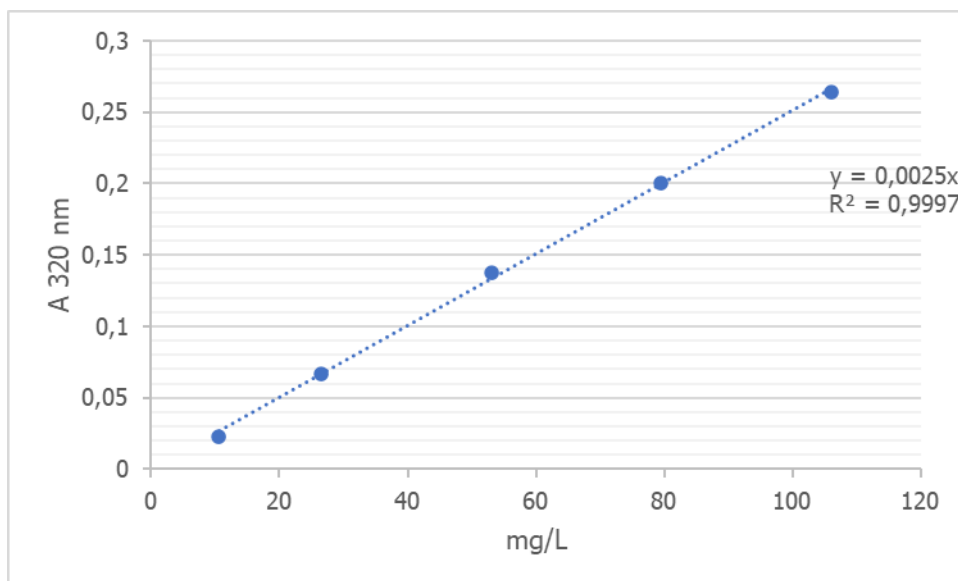
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.



**Slika 9.** Baždarni dijagram kafeinske kiseline za hidroksicimetne kiseline

#### **Klorogenska kiselina**

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

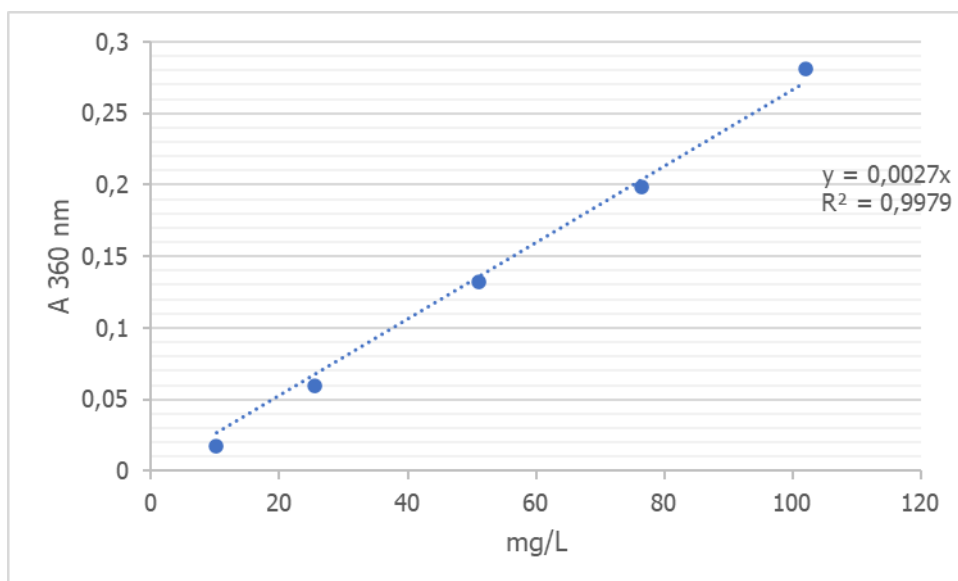


**Slika 10.** Baždarni dijagram klorogenske kiseline za hidroksicimetne kiseline

**b) *Kvercetin***

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.



**Slika 11.** Baždarni dijagram za ukupne flavonole



### 3.2.6. Određivanje biljnih pigmenata (klorofila i karotenoida)

Određivanje pigmenata bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u etil-acetatnom/acetonskom/etanolnom ekstraktu uzorka uz korištenje ekstrakcijskog otapala te mjerenjem pri valnim duljinama 649, 664, 470, 663.2, 646.8, 662 i 644 nm (Lichtenthaler i sur., 2001).

#### **Postupak određivanja:**

Kvantitativno određivanje provodi se spektrofotometrom pri sljedećim valnim duljinama: 649, 664, 644, 662, 646.8 i 663.2 nm, za klorofil *a* i *b* (u skladu sa korištenim ekstrakcijskim otapalom) i 470 nm za karotenoide. Pripremljene ekstrakte potrebno je razrijediti direktno u kivetama pomoću otapala koje je korišteno za ekstrakciju. Svako mjerenje provodi se u paraleli, a za slijepu probu koristi se otapalo koje je korišteno za ekstrakciju.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i sur., 2001):

#### Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad [2]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b)/209 \quad [3]$$

#### Etil-acetat:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 10.05 A_{662} - 0.766 A_{644} \quad [4]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 16.37 A_{644} - 3.140 A_{662} \quad [5]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1.280C_a - 56.7 C_b)/230 \quad [6]$$

#### 80 % aceton:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8} \quad [7]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 21.5 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2} \quad [8]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)/198 \quad [9]$$

gdje je:

A = apsorbancija,

C<sub>a</sub> = klorofil a,

C<sub>b</sub> = klorofil b,

C<sub>(x+c)</sub> = karotenoidi (ksantofili + karoteni).

### **3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom**

ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) prema mehanizmu djelovanja spada u HAT (engl. Hydrogen Atom Transfer) metodu koja se temelji na prijenosu atoma vodika, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2-amidinopropionamid)-dihidroklorid (AAPH), pri stalnoj temperaturi od 37 °C. Ova metoda je klasičan primjer antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala (Prior, 2015).

#### **Priprema uzoraka:**

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka ORAC metodom, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka (od 100 do 400 puta).

#### **Postupak određivanja:**

U jažicu mikrotitarske pločice otpipetira se 150 µL otopine fluorescina i 25 µL uzorka (75 mM fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda troloksa za izradu baždarnog pravca). Pločica s jažicama inkubira se u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja. Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija ( $\lambda_{eks.}$  485 nm i  $\lambda_{em.}$  520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25µL svježe pripremljenog 240 mM AAPH injektirano je softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta. Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz  $\lambda_{eks.}$  485 nm i  $\lambda_{em.}$  520 nm. Trolox služi kao standard i za izradu baždarnog pravca, a ispituje se antioksidacijski kapacitet otopine trolox različitih koncentracija (3,12 – 103,99 µM). MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany) za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom. ORAC vrijednosti izražavaju se kao (µmol TE L<sup>-1</sup>), odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao µmol TE/100 g s.tv.

## 4.REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na prinose fenolnih spojeva (masene udjele ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) te pigmenata (klorofila *a* i *b*) izoliranih iz osušenih i usitnjenih plodova rogača, listova i plodova mirte te listova tršlje. Provedena je sukcesivna ekstrakcija primjenom otapala rastuće polarosti (heksan, 80% aceton te 96% etanol) pri temperaturi od 65 °C i vremenu trajanja od 30 minuta. U svim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet primjenom ORAC metode. Ukupna suha tvar osušenih uzoraka prikazana je u tablici 1, dok su maseni udjeli fenolnih spojeva i pigmenata te antioksidacijski kapacitet prikazani u tablicama 2-4.

### 4.1. UKUPNA SUHA TVAR

**Tablica 1.** Ukupna suha tvar uzoraka rogača, mirte i tršlje

Uzorak	Udio suhe tvari (%)
Rogač	93,11
Mirta list	94,27
Mirta bobice	90,95
Tršlja	97,28

Udio suhe tvari u ispitivanim uzorcima bio je od 90,95 % do 97,28 % (Tablica 1). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja koja su proveli Boublenza i sur. (2019), Juvany i sur. (2013) i Tuberoso i sur. (2007).

## 4.2. UKUPNI FENOLI, FLAVONOIDI, FLAVONOLI I HIDROKSICIMETNE KISELINE

**Tablica 2.** Maseni udio ekstrahiranih ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina iz rogača, mirte i tršlje izražen kao prosječna vrijednost tri paralelna mjerenja  $\pm$  st. dev. (mg/100 g suh. tv.)

Uzorak	Otapalo	Ukupni fenoli (mg/100 g s.tv.)	Ukupni flavonoidi (mg/100 g s.tv.)	Ukupni flavonoli (mg/100 g s.tv.)	Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg/100 g s.tv.)
<b>Rogač</b>	Etil acetat	130,91 $\pm$ 2,36	1129,09 $\pm$ 4,31	17,18 $\pm$ 1,57	31,40 $\pm$ 1,16
	80% aceton	602,14 $\pm$ 3,61	329,91 $\pm$ 4,45	318,70 $\pm$ 2,80	250,74 $\pm$ 2,50
	96% etanol	96,00 $\pm$ 3,52	13,56 $\pm$ 1,10	93,74 $\pm$ 1,15	83,42 $\pm$ 1,17
<b>Mirta List</b>	Etil acetat	20,83 $\pm$ 0,10	150,26 $\pm$ 0,73	5,40 $\pm$ 0,27	23,14 $\pm$ 2,35
	80% aceton	6212,40 $\pm$ 6,61	1928,05 $\pm$ 2,16	965,79 $\pm$ 5,53	790,53 $\pm$ 2,00
	96% etanol	1212,32 $\pm$ 14,04	440,36 $\pm$ 1,83	253,02 $\pm$ 1,75	224,01 $\pm$ 0,46
<b>Mirta Bobice</b>	Etil acetat	148,92 $\pm$ 0,93	116,07 $\pm$ 1,83	48,47 $\pm$ 3,23	38,29 $\pm$ 1,23
	80% aceton	2828,02 $\pm$ 7,10	1243,27 $\pm$ 2,40	604,27 $\pm$ 0,97	418,79 $\pm$ 3,50
	96% etanol	1065,02 $\pm$ 4,76	395,73 $\pm$ 6,55	210,04 $\pm$ 0,99	184,19 $\pm$ 0,60
<b>Tršlja</b>	Etil acetat	55,56 $\pm$ 3,07	349,65 $\pm$ 1,81	18,13 $\pm$ 0,57	29,91 $\pm$ 1,37
	80% aceton	6379,11 $\pm$ 3,35	1716,20 $\pm$ 2,35	477,42 $\pm$ 2,13	424,24 $\pm$ 0,67
	96% etanol	4522,35 $\pm$ 2,71	891,61 $\pm$ 2,35	262,89 $\pm$ 2,36	279,20 $\pm$ 2,97

Rezultati određivanja pokazali su da najveći ekstrakcijski kapacitet za izolaciju ukupnih fenola ima druga frakcija tj. frakcija s 80%-tnim acetonom, a najmanji prva frakcija s etil-acetatom što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Makris i Kefalas (2004). Kod tršlje zabilježen je najveći udio ukupnih fenola, a visoke vrijednosti ukupnih fenola listova tršlje pokazali su i rezultati istraživanja Dahmounea i sur. (2014). Kod rogača zabilježen je najmanji udio ukupnih fenola (Tablica 2), a uzrok tome može biti specifičan kemijski sastav mahuna rogača koje su bogate šećerima koji mogu smetati prilikom određivanja sadržaja ukupnih fenola (Kumazawa i sur., 2002). Ekstrakti lista mirte pokazali su veći maseni udio ukupnih fenola od ekstrakata bobica mirte što se poklapa s rezultatima istraživanja Amensoura i sur. (2009).

Najbolji ekstrakcijski kapacitet za izolaciju ukupnih flavonoida je bio kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristio 80% aceton, osim kod rogača kada se koristio etil-acetat. Sve biljke pokazale

su se kao dobar izvor flavonoida, a posebice tršlja i list mirte što su demonstrirali i rezultati istraživanja koja su proveli Vaya i Mahmood (2006) te Dahmoune i sur. (2015).

Najbolji ekstrakcijski učinak flavonola je bio upotrebom 80%-tnog acetona, dok je najslabiji učinak za ekstrakciju iste skupine spojeva pokazala upotreba etil-acetata. Najveći udio flavonola određen je u lišću i bobicama mirte, a slične rezultate dobili su i Sarais i sur. (2016) uz razliku što su oni kao otapalo koristili 70%-tni metanol, a kao najdominantnije flavonole u mirti odredili su miricetin-3-O-galaktozid, miricetin-3-O-ramnozid, miricetin i kvercetin-3-ramnozid.

Slično kao i kod ekstrakcije flavonola, 80%-tni aceton pokazao se kao najbolje ekstrakcijsko otapalo i za hidroksicimetne kiseline. Rezultati istraživanja pokazali su da rogač sadrži najmanji udio hidroksicimetnih kiselina, što su ustvrdili i Torun i sur. (2013) od kojih su detektirali jedino sinapinsku i *p*-kumarinsku kiselinu. Aceton je najbolje ekstrahirao hidroksicimetne kiseline iz lista tršlje i u istraživanju Botsarisa i sur. (2015) u kojem su korištena 4 ekstrakcijska otapala: aceton, metanol, voda i butanol. Etil-acetat je najgore ekstrahirao ukupne hidroksicimetne kiseline, ali i općenito sve fenolne spojeve određivane u ovom istraživanju jer je etil-acetat nepolarno otapalo a polifenoli su većinom polarni spojevi te su nepolarna i visoko polarna otapala nepogodna za njihovu ekstrakciju. Srednje polarni medij predstavlja najbolje rješenje za ekstrakciju polifenola, a često se takav medij dobije miješanjem vode sa organskim otapalima (Rafiee i sur., 2011).

#### 4.3. BILJNI PIGMENTI (KLOROFILI I KAROTENOIDI)

**Tablica 3.** Maseni udio ekstrahiranih klorofila i karotenoida iz rogača, mirte i tršlje izražen kao prosječna vrijednost dva paralelna mjerenja  $\pm$  st. dev. (mg/100 g suh. tv.)

Uzorak	Otapalo	Klorofil a mg/100g (s.tv.)	Klorofil b mg/100g (s.tv.)	Karotenoidi mg/100g (s.tv.)
<b>Rogač</b>	Etil acetat	2,46 $\pm$ 0,00	3,32 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,03
	80% aceton	0,00 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	96% etanol	0,18 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,01
<b>Mirta List</b>	Etil acetat	4,29 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01	2,65 $\pm$ 0,01
	80% aceton	8,03 $\pm$ 0,01	4,92 $\pm$ 0,05	4,85 $\pm$ 0,01
	96% etanol	5,67 $\pm$ 0,01	3,33 $\pm$ 0,07	5,22 $\pm$ 0,01
	Etil acetat	1,03 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,01

<b>Mirta Bobice</b>	80% aceton	4,58±0,00	14,95±0,00	10,45±0,03
	96% etanol	1,02±0,00	5,52±0,01	3,18±0,02
<b>Tršlja</b>	Etil acetat	20,31±0,01	0,63±0,00	5,35±0,00
	80% aceton	16,09±0,05	13,13±0,02	7,03±0,01
	96% etanol	7,54±0,00	5,27±0,02	3,06±0,02

Pigmenti u rogaču bili su prisutni u najmanjim količinama što je i očekivano s obzirom na njegov specifični kemijski sastav. Maseni udio klorofila *a* najveći je bio u listovima mirte i tršlje što je bilo i za očekivati pošto je klorofil *a* zeleni pigment i glavni pigment u listovima biljaka. Acetonski ekstrakt bobica mirte nadmašio je sve ostale masene udjele klorofila *b* i karotenoida. Klorofil *b* je također dosta zastupljen u listovima, a rezultati pokazuju da ni bobice mirte ne zaostaju. Karotenoidi su zastupljeni svugdje osim kod rogača gdje su u minimalnom udjelu (Tablica 3).

#### 4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET – ORAC METODA

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta korištene su dvije frakcije uzoraka i to 80%-tni aceton i 96%-tni etanol.

**Tablica 4.** Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom ekstrakata rogača, mirte i tršlje izraženi u  $\mu\text{mol TE}/100\text{g s.tv.} \pm \text{st. dev.}$

<b>Uzorak</b>	<b>Otapalo</b>	<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE}/100\text{g s.tv.}</math>)</b>
<b>Rogač</b>	80% aceton	3391,18±190,10
	96% etanol	7533,62±318,52
<b>Mirta List</b>	80% aceton	63837,67±290,55
	96% etanol	36838,72±3250,87
<b>Mirta Bobice</b>	80% aceton	50788,30±952,92
	96% etanol	30268,26±1905,99
<b>Tršlja</b>	80% aceton	62248,44±1492,77
	96% etanol	42537,19±1520,99

Listovi mirte u obje frakcije pokazali su veću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta nego bobice mirte što se poklapa sa istraživanjem Pereire i sur. (2016). Generalna pretpostavka je da je voće tamnoplave, ljubičaste ili tamnocrvene boje uvijek povezano s većom antioksidativnom aktivnosti i to zbog prisustva antocijanina – grupe spojeva uvijek povezanih s visokim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta. U ovom slučaju čini se da su u listovima mirte prisutni spojevi s još većim antioksidacijskim kapacitetom od antocijanina. Prema Pereiri i sur. (2016) jedan ključan takav spoj je miricetin-3-O-ramnozid. Ostali spojevi koji bi mogli pridonijeti visokom antioksidacijskom kapacitetu mirte su flavanoli i flavonoli (Pereira i sur., 2017).

Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u dobivenim ekstraktima pokazali su da je tršlja imala visoki, a rogač niski antioksidacijski kapacitet. Svugdje osim kod rogača se acetonska frakcija pokazala kao bolji odabir za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom (Tablica 4).

## 5.ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i obrađenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- 1) Najveći ekstrakcijski kapacitet za izolaciju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola ima 80 % aceton (2. frakcija uzoraka).
- 2) Tršlja ima najveći maseni udio ukupnih fenola, a sve biljke pokazale su se kao dobar izvor flavonoida. Najveći maseni udio flavonola određen je u listovima mirte, dok je utvrđeno da rogač sadrži najmanje masene udjele hidroksicimetnih kiselina i pigmenata.
- 3) Najveći maseni udio klorofila *a* određen je u tršlji i u lišću mirte.
- 4) Acetonski ekstrakt bobica mirte ima najveći maseni udio klorofila *b* i karotenoida.
- 5) Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom, acetonska frakcija bila je bolji izbor te su sve biljke osim rogača pokazale visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.
- 6) Druga frakcija uzoraka ekstrahirana s 80% acetonom pokazala se kao najbolja frakcija uzoraka zbog najvećeg prinosa gotovo svih određivanih fenolnih spojeva i pigmenata te zbog najviših određenih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta gotovo svih ekstrakata.



## 6.LITERATURA

1. Aguirre-Joya J.A., Chacón-Garza L.E., Valdivia-Najár G., Arredondo-Valdés R., Castro-López C., Ventura-Sobrevilla J.M., Aguilar-González, Cristó.N., Boone-Villa D. (2020) Nanosystems of plant-based pigments and its relationship with oxidative stress, *Food and Chemical Toxicology*, 111433.
2. Amensour M., Sendra E., Abrini J., Bouhdid S., Pérez-Alvarez J. A., Fernández-López J. (2009) Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Myrtle (*Myrtus communis*) Extracts. *Natural Product Communications* **4**(6), 819-824.
3. AOAC (1984) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC
4. Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K. M., Özyürek M., Güçlü K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **85**(5), 957–998.
5. Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A. (1997) Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* **10**, 166–172.
6. Azib L., Debbache-Benaida N., Costa G. D., Atmani-Kilani D., Saidene N., Ayouni K., Richard T., Atmani D. (2019) *Pistacia lentiscus* L. leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Industrial Crops and Products* **137**, 576–584.
7. Azmir J., Zaidul I., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahen F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N., Omar A. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* **117**, 426-436.
8. Baratto M.C., Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Romani A., Visioli F., Basosi R., Pogni R. (2003) Antioxidant activity of Galloyl Quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free Radical Research Communications* **37**, 405–412.
9. Barboni T., Cannac M., Massi L., Perez-Ramirez Y., Chiaramonti N. (2010) Variability of Polyphenol Compounds in *Myrtus Communis* L. (Myrtaceae) Berries from Corsica. *Molecules* **15**(11), 7849–7860.
10. Botella-Pavía P., Rodríguez-Concepción M. (2006) Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum* **126**, 369–381.
11. Botsaris G., Orphanide, A., Yiannakou E., Gekas V., Goulas V. (2015) Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Extracts in Pork Sausages. *Food Technology and Biotechnology* **53**(4), 472-478.

12. Boublenza I., El haitoum A., Ghezlaoui S., Mahdad M., Vasai F., Chemat F. (2019) Algerian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations. Morphological and chemical variability of their fruits and seeds. *Scientia Horticulturae*, 108537.
13. Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317 - 333.
14. Celep G. S., Rastmanesh R., Marotta F. (2014) Microbial Metabolism of Polyphenols and Health. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 577–589.
15. Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**(3), 178-182.
16. Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C., Baraldi M. (2002) Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* **73**, 674–684.
17. Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* **166**, 585–595.
18. Dahmoune F., Spigno G., Moussi K., Remini H., Cherbal A., Madani, K. (2014) *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* **61**, 31–40.
19. González de Peredo A.V., Vázquez-Espinosa M., Espada-Bellido E., Ferreiro-González M., Amores-Arocha A., Palma M., F. Barbero G. and Jiménez-Cantizano A. (2019) Alternative Ultrasound-Assisted Method for the Extraction of the Bioactive Compounds Present in Myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules* **2019**, 24, 882.
20. Gutteridge J.M.C. (1994) *Reviews in Clinical Gerontology* **4**, 279.
21. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
22. Handa S., Khanuja S., Longo G., Rakesh D. (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste, str. 260.
23. Howard L.R., Clark J.R., Brownmiller C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**(12), 1238-1247.

24. Juvany M., Müller M., Munné-Bosch S. (2013) Plant age-related changes in cytokinins, leaf growth and pigment accumulation in juvenile mastic trees. *Environmental and Experimental Botany* **87**, 10–18.
25. Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R., He X. (2014) Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 377-392.
26. Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M.-S., Nakayama T. (2002) Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(2), 373–377.
27. Landau S., Muklada H., Markovics A., Azaizeh H. (2014) Traditional Uses of Pistacia lentiscus in Veterinary and Human Medicine. *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East* 163–180.
28. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* **1**(1), F4-3.
29. Makris D.P., Kefalas P. (2004) Carob Pod Polyphenolic Antioxidants. *Food Technology and Biotechnology* **42**(2), 105–108.
30. Manousi N., Sarakatsianos I., Samanidou V. (2019) Engineering Tools in the Beverage Industry, 3.izd., str. 283-314.
31. Marakis S. (1996) Carob bean in food and feed: current status and future potentials - a critical appraisal, *Journal of Food Science and Technology* **33**, 365–383.
32. Marrugat J., Covas M.I., Fito M., Schroder H., Miro-Casas E., Gimeno E., et al. (2004) Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition* **43**(3): 140-7.
33. Messaoud C., Béjaoui A., Boussaid M. (2011) Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L. var. *italica* Mill. morph populations. *Biochemical Systematics and Ecology* **39**(4-6), 570–580.
34. Mulet A., Fernández-Salguero J., García-Pérez J. V., Bon J. (2015) Mechanistic modeling to address process analysis: Kibbles of carob (*Ceratonia siliqua*, L.) pod extraction. *Journal of Food Engineering* **176**, 71–76.
35. Ortega N., Macià A., Romero M.P., Trullols E., Morello J.R., Anglès N., Motilva M.J. (2009) Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flour by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 7239–7244.

36. Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Haber B. (2003) Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology* **41**, 1727–1738.
37. Papagiannopoulos M., Wollseifen H.R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R. (2004) Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3784–3791.
38. Pereira P., Cebola M.-J., Oliveira M. C., Bernardo Gil M. G. (2017) Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds of *Myrtus communis* L. extract obtained by ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology* **54**(13), 4362–4369.
39. Pereira P., Cebola M.-J., Oliveira M. C., Bernardo-Gil M. G. (2016) Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids* **113**, 1–9.
40. Prior R. L. (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods* **18**, 797– 810.
41. Rafiee Z., Jafari S. M., Alami M., Khomeiri M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *Journal of Animal and Plant Sciences* **21**, 738-745.
42. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**(7): 933-56.
43. Rojas J., Buitrago A. (2019) Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications, str. 3-31.
44. Romani A., Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Tattini A. (2002) Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemical Analysis* **13**: 79–86.
45. Rtibi K., Selmi S., Grami D., Amri M., Eto B., El-benna J., Sebai H., Marzouki L. (2017) Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **93**, 522–528.
46. Sarais G., D'Urso G., Lai C., Pirisi F. M., Pizza C., Montoro P. (2016) Targeted and untargeted mass spectrometric approaches in discrimination between *Myrtus*

- communis* cultivars from Sardinia region. *Journal of Mass Spectrometry* **51**(9), 704–715.
47. Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**(4): 287-306.
  48. Shams K., Abdel-Azim N., Saleh I., Hegazy M., El-Missiry M., Hammouda F. (2015) Green technology: economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **7**(5), 1050–1074.
  49. Sharma R. (2014) Polyphenols in Health and Disease. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 757–778.
  50. Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98** (4) 828–834.
  51. Taamalli A., Iswaldi I., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Zarrouk M. (2013) UPLC-QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochemical Analysis* **25**(1), 89–96.
  52. Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T. (2011) Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* **9**, 1-5.
  53. Torun H., Ayaz F. A., Colak N., Grúz J., Strnad M. (2013) Phenolic Acid Content and Free Radical-Scavenging Activity of Two Differently Processed Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Pod. *Food and Nutrition Sciences* **04**(05), 547–553.
  54. Tuberoso C. I. G., Melis M., Angioni A., Pala M., Cabras, P. (2007) Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L. *Food Chemistry* **101**(2), 806–811.
  55. Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. (2018) Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* **2018**, 5, 93.
  56. Vaya J., Mahmood S. (2006) Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors* **28**(3-4), 169–175.
  57. Wang H., Cao G., Prior R.L. (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(3), 701-5.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

David Kolanović

ime i prezime studenta