

Bioaktivni spojevi i antioksidacijska aktivnost mirte, tršlje i lovora

Dizdar, Lucija

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:159:116474>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Lucija Dizdar

7210/PT

**BIOAKTIVNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST MIRTE,
TRŠLJE I LOVORA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić

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 kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Bioaktivni spojevi i antioksidacijska aktivnost mirte, tršlje i lovora

Lucija Dizdar, 0058208637

Sažetak: Mirta, tršlja i lovor mediteranske su biljke koje se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Bogate su bioaktivnim spojevima i značajan su prirodni izvor antioksidansa. Fenolni spojevi mirte, tršlje i lovora pokazuju značajnu biološku aktivnost, a brojnim istraživanjima utvrđeno je njihovo antimikrobno i antioksidativno djelovanje. Najzastupljeniji fenolni spojevi u lišću i plodovima navedenih biljaka su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva mirte kreće se od $346,89 \pm 7,56$ do $714,33 \pm 4,69$ mg GAE/g, tršlje od $103,34 \pm 2,32$ do $216,29 \pm 20,62$ mg GAE/g i lovora od 22,90 do 80,30 mg GAE/g. Fenolni spojevi mogu se izolirati iz različitih biljnih dijelova kao što su listovi, cvjetovi, stabljika i plodovi koristeći različite metode ekstrakcije. Metode izolacije mogu se podijeliti na konvencionalne metode ekstrakcije otapalima te nove nekonvencionalne tehnike kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima, te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE).

Ključne riječi: *ekstrakcija, fenolni spojevi, lovor, mirta, tršlja*

Rad sadrži: 35 stranica, 4 slike, 0 tablica, 94 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić

Datum obrane: 1.9.2020.

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 Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Bioactive compounds and antioxidant activity of myrtle, mastic tree and laurel

Lucija Dizdar, 0058208637

Abstract: Myrtle, mastic tree and laurel are Mediterranean plants used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. They are rich in bioactive compounds and are significant natural source of anti-oxidants. Phenolic compounds in myrtle, mastic tree and laurel show significant biological activity and their antimicrobial and antioxidant activity has been established in numerous reports. The most common phenolic compounds in leaves and fruits of these plants are phenolic acids, flavonoids and tannins. The concentration of total phenolic compounds ranges from 346.89 ± 7.56 to 714.33 ± 4.69 mg GAE / g (myrtle), 103.34 ± 2.32 to 216.29 ± 20.62 mg GAE/g (mastic tree) and 22.90 to 80.30 mg GAE / g (laurel). Phenolic compounds can be isolated from various plant parts such as leaves, flowers, stems and fruits using different extraction techniques. Isolation methods can be divided into conventional methods and new non-conventional techniques such as ultrasonic-assisted extraction, microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction, and accelerated solvent extraction at elevated pressure.

Keywords: *extraction, phenolic compounds, laurel, myrtle, mastic tree*

Thesis contains: 35 pages, 4 figures, 0 tables, 94 references, 0 supplements

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: doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić

Defence date: September 1st 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lovor	2
2.1.1. Kemijski sastav lovora	2
2.1.2. Fenolni spojevi lovora	3
2.1.3. Antioksidacijska aktivnost lovora	4
2.2. Mirta	5
2.2.1. Kemijski sastav mirte	6
2.2.2. Fenolni spojevi mirte.....	7
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost mirte	8
2.3. Tršlja	9
2.3.1. Kemijski sastav tršlje.....	10
2.3.2. Fenolni spojevi tršlje	10
2.3.3. Antioksidacijska aktivnost tršlje.....	11
3. IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA	12
3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije	12
3.1.1. Ekstrakcija otapalima	12
3.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije.....	16
3.2.1. Ekstrakcija superkričnim fluidima.....	16
3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	18
3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	20
3.2.4. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Accelerated Solvent Extraction - ASE).....	23
4. ZAKLJUČAK	25
5. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Mirta, tršlja i lovor biljke su koje prirodno rastu na mediteranskom području. Primjenjuju se u prehrambenoj industriji kao začim, u proizvodnji alkoholnih pića itd., u medicinske svrhe kod liječenja raznih stanja i bolesti, a mirta i u kozmetičke svrhe u proizvodnji parfema.

Navedene biljke bogate su bioaktivnim spojevima čija aktivnost značajno doprinosi terapijskim svojstvima ovih biljaka pa se tako one mogu koristiti kod tretiranja astme, ekcema, zacjeljivanja rana, loše probave itd., kao i preventivno protiv bolesti koje su povezane s djelovanjem slobodnih radikala. Fenolni spojevi (fenolne kiseline, flavonoidi, tanini) zajedno s eteričnim uljima imaju značajno antimikrobno (antibakterijsko, antiviralno i antifungalno) i antioksidativno djelovanje.

Antioksidansi su sastojci koji su sposobni usporiti ili u potpunosti zaustaviti autooksidaciju zbog njihove sposobnosti stupanja u interakcije sa slobodnim radikalima pri čemu zaustavljaju lančanu reakciju oksidacije (Režek Jambrak i Drmić, 2010). U zadnje vrijeme sve se više nastoji sintetske antioksidanse zamijeniti onima iz prirode. Zbog sumnji u potencijalnu toksičnost i kancerogenost nekih sintetskih antioksidansa (npr. butiliranog hidroksianisola (BHA) i butiliranog hidroksitoluena (BHT)) sve više raste interes znanstvenika za izolacijom antioksidansa iz prirodnih izvora (Moure i sur., 2001).

Metode izolacije bioaktivnih spojeva mogu se podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne tehnike. Nekonvencionalne tehnike u zadnje vrijeme postaju sve popularnije zbog brojnih prednosti kao što su skraćeno vrijeme ekstrakcije, bolja kvaliteta ekstrakta, smanjeno onečišćenje okoliša i sl. Odabir ekstrakcijskog otapala, metode i parametara ekstrakcije značajno utječe na sastav ekstrakta, a samim time i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta jer je brojnim istraživanjima utvrđeno da veći udio fenolnih spojeva ukazuje na veću antioksidacijsku aktivnosti.

Cilj ovog rada bio je napraviti pregled fenolnog sastava mirte, tršlje i lovora. Za svaku biljku navedena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva te najzastupljeniji sastojci i njihove koncentracije. Osim toga, cilj rada bio je napraviti pregled korištenih metoda ekstrakcije u kojemu su navedeni parametri ekstrakcije te koncentracije izoliranih sastojaka dobivene primjenom klasičnih i nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lovor

Lovor ili lovorika (*Laurus nobilis* L.) je biljka koja pripada porodici lovora (*Lauraceae*). Raste u obliku vazdazelenog grma ili niskog stabla, pojedinačno ili u skupinama (najčeće u listopadnoj šumi, a u makiji rjeđe). Vazdazeleni, kožasti list nalazi se na kratkoj peteljci te je eliptičnog i zašiljenog oblika. Žućkasto-bijeli cvjetovi razvijaju se u obliku čuperaka u pazušcima listova pri čemu se prašnički i tučkovi cvjetovi razvijaju na različitim stablima (Slika 1). Lovor cvate u proljeće od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasnu jesen (Kuštrak, 2005). Bobice lovora su jednosjemeni, jajoliki plodovi tamnoljubičastog, tankog i naboranog perikarpa. Rascjepljivanjem perikarpa izdvaja se koštica čija je sjemena ovojnica vezana uz unutarnju površinu perikarpa (Petkova i sur., 2019). Prirodno stanište lovora je u Maloj Aziji, a kasnije se raširio po zemljama u okolici Sredozemnog mora. U Hrvatskoj je lovor najviše rasprostranjen u Istri, Hrvatskom Primorju i Dalmaciji. Raste u priobalju i na otocima (Kuštrak, 2005).

U starom vijeku lovor su smatrali svetim stablom, a stari Grci posvetili su ga bogu Apolonu i sadili ga uz njegove hramove. Listovi i plodovi lovora rabe se od davnine kao začini u mnogim jelima od mesa i ribe, juhama i spremanju zimnice, može se koristiti kao lijek za bolove u želucu, nadimanje, lošu probavu te za dobivanje eteričnog ulja (Kuštrak, 2005).



Slika 1. *Laurus nobilis* (Anonymus 1, 2020)

2.1.1. Kemijski sastav lovora

Lovorov list sadrži 0,8-3% eteričnog ulja, a u sušenim bobicama prisutno je 0,6-10% ulja pri čemu razlike u udjelima ovise o načinu uzgoja te skladištenju biljnog materijala. Uz eterična

ulja, u kemijski sastav bobica ulaze i masna ulja (Kaurinovic i Vastag, 2019). Općenito, najzastupljenije kemijske sastavnice lovora su fenolni spojevi i eterično ulje.

Prema velikom broju istraživanja 1,8-cineol glavna je sastavnica eteričnog ulja lovorova lista (do 70%), zatim slijedi eugenol, acetileugenol, metil eugenol, α - and β -pinen, felsenren, linalol, geraniol i terpineol (Kaurinovic i Vastag, 2019). Seskviterpeni, najraznolikiji metaboliti lovorovog lista, pokazuju značajne farmakološke učinke, uključujući antimikrobne (Fraga, 2003) i imunomodulatorne (Park i sur., 1996). Ukupno je izolirano 22 seskviterpena, uključujući 10 seskviterpenskih laktona i metil estera. Većina tih sastojaka pokazala je umjereno do značajno citotoksično djelovanje protiv K562 stanica leukemije (Julianti i sur, 2012). Enantiomeri α -pinena, α -pinen, limonen i linalol imaju snažan antimikrobni učinak (Magiatis i sur., 1999; Filipowich i sur., 2003; Koji i sur., 2004; Derwich i sur., 2009).

Najzastupljeniji sastojci eteričnog ulja lovora lista s područja Maroka su 1,8-cineol (52,43%), zatim α -terpinil acetat (8,96%), sabinen (6,13%), limonen (5,25%), α -pinen (3,72%) i β -pinen (3,14%). Sličan sastav eteričnog ulja lovora određen je u uzorcima i na drugim geografskim područjima (Derwich i sur., 2009).

Petkova i sur. (2019) istraživali su kemijski sastav plodova lovora podrijetlom iz Grčke i Gruzije. Kao glavni sastojci eteričnog ulja podrijetlom iz Grčke određeni su: 1,8-cineol (18,2%), α -felandren (15,0%), β -pinen (9,4%), α -pinen (9,1%), α -terpinil acetat (7,9%), sabinen (6,3%), kampen (4,2%), germakren D (3,7%) i β -kariofilen (3,0%). Kao glavni sastojci eteričnog ulja lovora podrijetlom iz Gruzije određeni su: trans- β -ocimen (59,4%), 1,8-cineol (7,6%), β -kariofilen (4,5%), kariofilen oksid (4,0%), β -elemen (4,0%) i cis- β -ocimen (3,4%).

2.1.2. Fenolni spojevi lovora

Sadržaj fenolnih spojeva lovora značajno varira ovisno o dijelu i podrijetlu biljke, vremenu berbe kao i primjenjenom ekstrakcijskom otapalu i samoj metodi izolacije.

Prema Kaurinovic i Vastag (2019) udio ukupnih fenolnih sastojaka ekstrakata lovorova lista najmanji je u etanolnom ekstraktu (2,41 mg GAE/g suhe tvari), a najviši u ekstraktu etil-acetata (4,53 mg GAE/g suhe tvari). Značajan udio fenolnih spojeva također je zamjećen u ekstraktu n-butanola (3,96 mg GAE/g suhe tvari). Najviši udio ukupnih flavonoida određen je u ekstraktu etil-acetata (1,56 mg GAE/g) i n-butanolnom ekstraktu (1,07 mg GAE/g), nešto manji u CHCl_3 ekstraktu te najmanji u ekstraktu etanola i vodenom ekstraktu.

Papageorgiou i sur. (2007) istraživali su uzorke lovorova lista prikupljene u ožujku, svibnju, kolovozu i rujnu 2007. i došli su do zaključka da fenolni sastav značajno ovisi o fazi razvoja biljnog materijala. Ukupni udio fenolnih spojeva najviši je tijekom faze dozrijevanja plodova (80,30 mg GAE/g suhog biljnog materijala), a najniži na kraju faze dozrijevanja plodova (22,90 mg GAE/g). Rezultati se značajno razlikuju od perioda kad je lovor u punom cvatu (51,30 mg GAE/g) i pupanja (42,60 mg GAE/g).

Prema Kaurinovic i Vastag (2019) glavni flavonoidi lovorova lista su derivati kvercetina i kaempferola. Metodom tekućinske kromatografije (LC-MS) kao glavni spojevi skupine flavonoida utvrđeni su kaempferol-3-O-glukozid (56,15 µg/g suhog materijala), kvercetin (21,62 µg/g) i rutin (17,44 µg/g). Određen je i visok sadržaj fenolnih kiselina i to kafeinske (16,18 µg/g), klorogenske (13,11 µg/g) i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (38,46 µg/g). Ostatak fenolnih kiselina nije utvrđen (Kaurinovic i Vastag, 2019).

Prema Dias i sur. (2014a) fenolni spojevi određeni u lovorovu listu pripadaju grupama flavan-3-ola, flavonola i flavona te su uspoređeni udjeli fenolnih komponenti u listu kultiviranog i divljeg lovora te u metanolnom i vodenom ekstraktu. Ista grupa znanstvenika dokazala je da je u kultiviranim uzorcima veća koncentracija flavonoida i flavona dok metanolni ekstrakti sadrže veću koncentraciju flavan-3-ola (Dias i sur., 2014b).

U plodovima lovora Petkova i sur. (2019) su utvrdili 12 fenolnih kiselina. Istraživanjem je također utvrđen visok udio flavonoida (miricetin, kvercetin, kaempferol). Najzastupljenija fenolna kiselina u plodovima grčkih lovora bila je *p*-kumarinska kiselina (261,60 µg/g u slobodnom obliku) i vanilinska kiselina (253,00 µg/g u slobodnom obliku i 925,80 µg/g u konjugiranom obliku). U plodovima lovora podrijetlom iz Gruzije najzastupljenije fenolne kiseline su vanilinska (105,60 µg/g u slobodnom obliku), kafeinska kiselina (439,20 µg/g) i siringinska kiselina (390,70 µg/g). Najveće razlike u sastavu fenolnih kiselina plodova s navedenih lokacija vidljive su u udjelima *p*-kumarinske i vanilinske kiseline (u slobodnom obliku) i vanilinske i sinapinske kiseline (u konjugiranom obliku).

2.1.3. Antioksidacijska aktivnost lovora

Brojna istraživanja su potvrdila da fenolni spojevi lovora pokazuju značajnu antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost djelujući inhibitorno na proizvodnju NO radikala, natrij-kalij adenozin

trifosfatazu i tumorskih staničnih linija (HeLA, MCF7, NCI-H460 i HCT15) (Konovalov i Alieva, 2019).

Prema Kaurinovic i Vastag (2019) određena je antioksidacijska aktivnost u ekstraktima lovorovog lista pri čemu je ekstrakcija provedena u različitim otapalima te su promatrane IC50 vrijednosti ekstrakata (koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju danoga parametra (Pravilnik o postojećim tvarima, 2008)), tj. inhibitorni utjecaj na određene radikale. Dobiveni rezultati ukazuju na značajnu sposobnost flavonoida u djelovanju protiv DPPH radikala i vrlo veliku povezanost između ukupnih fenolnih spojeva i sposobnosti etil-acetatnog ekstrakta da neutralizira DPPH radikale (IC50 = 83,24 µg/mL). Etil-acetat pokazao se i kao najbolje otapalo za neutralizaciju O₂⁻ radikala (IC50=163,57 µg/mL), NO radikala (158,63 µg/mL) i OH radikala (121,84 µg/mL). Osim fenolnih spojeva, i druge komponente lovora imaju antiradikalno i antioksidativno djelovanje, kao što su terpenoidi i seskviterpeni.

Conforti i sur. (2006) utvrdili su da lišće divljeg lovora ima veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kultivirani lovor pri čemu IC50 za kultivirani lovor iznosi 378,00 µg/mL, a za divlji 115,00 µg/mL.

Dall'Acqua i sur. (2009) istraživali su antioksidacijsku aktivnost infuzije lovorovog lista *in vitro* metodama po Briggs-Rauscher (BR) i Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Obje metode su potvrdile da su izolirani derivati kvercetina i katehina aktivnije komponente u odnosu na kaempferol. Ti podaci potvrđuju da kateholna grupa u derivatima flavonoida poboljšava antioksidacijski kapacitet što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Pietta, 2000).

2.2. Mirta

Mirta (*Myrtus communis L.*) je endemska biljna vrsta porodice mirta (*Myrtaceae*) specifična za Mediteransko područje. Prirodno raste u području južne Europe, sjeverne Afrike i zapadne Azije. Mirta je zimzelena biljka i njene grančice gusto su prekrivene kožastim listovima, dugim 3-5 cm (Slika 2) i izrazito bogatim taninima, flavonoidima i hlapljivim uljima (Baytop, 1999). Izrazito je aromatična zbog visokog udjela esencijalnih ulja u listovima, cvjetovima i bobicama. Cvjetovi su srcolikog oblika, bijele ili roze boje (Mahmoud i sur., 2010).

Već dugi niz godina koristi se zbog izrazito značajnih prehrambenih i ljekovitih svojstva. Tako se lišće, bobice, cvjetovi i grančice mirte mogu koristiti za razne prehrambene (začini, alkoholna pića), kozmetičke (parfemi) i terapijske svrhe (liječenje astme, psorijaze, proširenih vena,

urinarnih infekcija, zacjeljivanje rana itd.) (Messaoud i sur., 2012; Gortzi i sur., 2008; Chalchat i sur., 1998; Clark, 1996; Baytop, 1999; Elfellah i sur., 1984; Serce i sur.; 2010; Ziyvat i sur., 1997; Le Floch, 1983).



Slika 2. *Myrtus communis* (Anonymous 2, 2020)

2.2.1. Kemijski sastav mirte

Glavni sekundarni metaboliti mirte su polifenoli i esencijalna ulja. Brojna istraživanja potvrdila su prisutnost specifičnih kemijskih spojeva u određenim dijelovima biljke. Lišće i cvijeće sadže esencijalna ulja, fenolne kiseline, flavonoide i tanine (Messaoud i sur., 2005; Aidi Wannas i sur., 2010), pri čemu su glavni sastojci suhog lišća 1,8-cineol (13,5-19,6%), linalol (7,7-15,8%), linalil acetat (2,5-6%), terpineol i terpinolen (Chryssavgj i sur., 2008). Bobice sadržavaju tanine, antocijanine (0,2-54%), masne i organske kiseline (9-52%), a njihov udio ovisi o otapalu korištenom tijekom ekstrakcije, periodu dozrijevanja te dijelu biljke (Martin i sur., 1990; Tuberoso i sur., 2010, Messaoud i sur., 2012). Generalno, najčešći spojevi prisutni u lišću, cvjetovima i stabljici mirte su α -pinen (10-60%) i 1,8-cineol (12-34%) (Aidi Wannas i sur., 2010).

Kemijske sastavnice mirte pokazuju značajna antimikrobna (antibakterijska, antiviralna i antifungalna) svojstva. Primjerice, 1,8-cineol, linalol, eugenol, α -terpineol i γ -terpinen, kao i komponente mirtinog eteričnog ulja imaju dobar baktericidni učinak na neke Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (Oyedemi i sur., 2009; Randrianarivelo i sur., 2009). Zanetti i sur. (2010) dokazali su da pojedine komponente kao što su limonen, 1,8-cineol i α -pinen pokazuju značajnu aktivnost protiv sojeva *M. tuberculosis*. Određene komponente djeluju i protiv sojeva bakterije *S. aureus* (Appendino i sur., 2002).

Kompleksnost sastava ekstrakata i eteričnog ulja pretpostavlja različite mehanizme djelovanja pa je zbog toga teško odrediti jedan univerzalni mehanizam. Pretpostavlja se da svaka od komponenti ima svoj vlastiti mehanizam djelovanja, ili s druge strane, da određene komponente djeluju sinergistički (Džilani i Dicko, 2012).

2.2.2. Fenolni spojevi mirte

Polifenolni sastojci mirte mogu se podijeliti u tri glavne grupe: fenolne kiseline, tanini i flavonoidi. Fenolne kiseline u sastavu mirte su galna, elaginska, kafeinska, vanilinska, siringinska i ferulinska kiselina. Tanini uključuju hidrolizirane tanine (galotanini) i proantocijanidine (kondenzirani tanini). Identificirani flavonoidi su miricetin, kvercetin, katehin i njihovi derivati (Aleksic i Knezevic, 2014).

Fenolni sastav ekstrakata može značajno varirati, ovisno o dijelu biljke uzetom za ekstrakciju. Aidi Wannes i sur. (2010) potvrdili su da sadržaj ukupnih fenola, tanina, flavonoida i proantocijanidina varira u različitim dijelovima biljke. Amensour i sur. (2009) dokazali su da list sadrži puno veći udio ukupnih fenolnih sastojaka u odnosu na ekstrakte bobica. Listovi i cvjetovi bogati su ukupnim taninima, dok je stabljika umjereno bogata flavonoidima (katehin) i relativno siromašna taninima. Flavanoli i flavonoli u mirti su prisutni u relativno velikim količinama, s iznimkom derivata kvercetina i fenolnih kiselina, koje su nađene tek u malim količinama (Aidi Wannes i sur., 2010; Romani i sur., 1999; 2004).

Prema Nassar i sur. (2010) sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u alkoholnom ekstraktu iznosio je $472,47 \pm 3,73$ mg GAE/ g biljnog materijala, u kloroformnom $346,89 \pm 7,56$ mg GAE/ g te $714,33 \pm 4,69$ mg GAE/ g u etil-acetatnom ekstraktu lista mirte. Sadržaj ukupnih flavonoida u alkoholnom ekstraktu iznosio je $281,15 \pm 21,88$ mg RE/ g, u kloroformnom $44,78 \pm 8,98$ mg RE/g i u etil-acetatnom ekstraktu $153,62 \pm 13,27$ mg RE/ g. Yoshimura i sur. (2008) identificirali su 10 fenolnih sastojaka iz lista mirte uključujući četiri hidrolizirana tanina (oenotein B, eugeniflorin D2, telimagrandin I i II), četiri flavanola (miricetin 3-O- β -D-ksilozid, miricetin 3-O- β -D-galaktozid, miricetin 3-O- β -D-galaktozid 6-O-galat i miricetin 3-O- α -l-ramnozid) i dvije fenolne kiseline (galna kiselina i 3,5-di-O-galoil kina kiselina).

Corredu i sur. (2019) određivali su fenolni sastav bobica mirte (kao nusproizvoda proizvodnje likera) u alkoholno-vodenom ekstraktu. Fenolni sastav određivali su u sjemenkama, perikarpu i ocijeđenim bobicama. Sadržaj ukupnih polifenola najveći je u sjemenkama ($566,00$ mg/ 100 g

biljnog materijala). Elaginska kiselina najznačajnija je komponenta u uzorcima sjemenki (345,00 mg/100 g), zatim u ocijeđenim bobicama (281,00 mg/100 g) te u perikarpu (244,00 mg/100 g). Ostale značajnije fenolne kiseline su galna (63,00 -123,00 mg/100 g) i kina kiselina (77,00-121,00 mg/100 g). Od flavonoida, najzastupljeniji su kvercetin u koncentraciji 21,00 mg/100 g, kvercetin-3-O-ramnozid u koncentraciji 24,00 mg/100 g (izmjerene vrijednosti dobivene su u sjemenkama) i izohamnetin koji je zastupljen u koncentracijama 8,00 - 15,00 mg/100 g. Miricetin-3-O-galaktozid najzastupljeniji je u perikarpu (10,00 mg/100 g). Antocijani nisu utvrđeni niti u jednom od uzoraka.

Prema Tuberoso i sur. (2010) na kemijski sastav ekstrakta značajno utječe ekstrakcijsko otapalo korišteno tijekom pripreme ekstrakata. Tuberoso i sur. (2010) dokazali su da etanolni i vodeni ekstrakti pokazuju veći udio ekstrahiranih komponenti u usporedbi s ekstraktima etil-acetata, pri čemu najveći udio fenolnih sastojaka sadrži etanolni ekstrakt. Najveća antioksidativna i antiradikalna aktivnost zamijećena u etanolnom ekstraktu i ekstraktu etil acetata. Njihovi rezultati upućuju na to da postoji velika povezanost između udjela ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima lista mirte.

2.2.3. Antioksidacijska aktivnost mirte

Antioksidacijska aktivnost mirte prvenstveno potječe od antocijana, flavonoida i fenolnih kiselina. (Aleksic i Knezevic, 2014). Antioksidacijska aktivnost fenolnih sastojaka pripisuje se njihovim redukcijskim svojstvima, koja im omogućavaju da djeluju kao reducirajući agensi, donori vodika, metal kelati, a djeluju i na singletni kisik (Rice-Evans i sur., 1995).

Mnoga *in vitro* istraživanja utvrdila su da fenolni spojevi kao što su fenolne kiseline i flavonoidi pokazuju antioksidativnu aktivnost, a ta aktivnost ovisi o broju i položaju fenolnih hidroksilnih skupina u aromatskom prstenu (Duthie i Crosier, 2000). Oligomerni proantocijanidini imaju sposobnost hvatanja lipidnih peroksida i slobodnih radikala, kao i nekompetitivnog inhibitora ksantin oksidaze koja je glavni proizvođač slobodnih radikala (Fine, 2000; Okuda, 2000). Različiti poznati antioksidansi kao što su flavonoidin tanini i α -tokoferol izolirani su iz mirtinih ekstrakata. Mirta također pokazuje značajnu biološku aktivnost tanina, uključujući antitumorsku i antioksidativnu (Romani i sur., 2004). Općenito gledano, monofenoli su manje učinkoviti od polifenola, a fenolni aglikoni imaju veću antioksidacijsku aktivnost od njihovih pripadajućih glikozida (Duthie i Crosier, 2000).

List nije namjenjen za direktnu upotrebu zbog njegove izrazite gorčine koju stvaraju terpeni. Bobice se, s druge strane, koriste u proizvodnji likera, džemova i drugih prehrambenih proizvoda (Aleksic i Knezevic, 2014). Tuberoso i sur. (2007) došli su do zaključka kako je antioksidacijska aktivnost sastojaka bobica u značajnoj vezi s ukupnim fenolima, iako oni nisu istraživali doprinos svakog pojedinačnog sastojka.

2.3. Tršlja

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je mediteranska biljka snažne i karakteristične arome iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). U Hrvatskoj raste u priobalnom području Istre, Kvarnera i Dalmacije. Raste u obliku zimzelenog grma ili niskog stabla, njena kora u mladosti je zelenosiva i glatka, a s vremenom postaje tamnija, a njena tekstura grublja. Listovi su jajoliki i kožasti, tamnozeleni na licu, a naličje im je svjetlozeleno i specifičnog su mirisa. Tršlja cvate u razdoblju od ožujka do svibnja te tvori male cvjetove, građene od jednostavnog ocviječja kojeg čini nekoliko tamnocrvenih listića. Plodovi su jednosjemeni i crvene su boje (Slika 3), a kada dozriju potamne i njihova boja se mijenja u crnu (Anonymous 4, 2020).

Mnogi dijelovi biljke koristili su se još u tradicionalnoj medicini kao stimulans i diuretik te za tretiranje hipertenzije, kašlja, upale grla, ekcema, bolova u trbuhu i bubrežnih kamenaca. Sirovi ili prženi plodovi bogati eteričnim uljem koristili su se kod liječenja psorijaze i ulkusa (Benhammou i sur., 2008). Zbog značajnog terapijskog učinka određeni dijelovi tršlje korišteni su i u prehrambenoj industriji. Primjerice, eterično ulje koristilo se kao aroma u alkoholnim pićima i žvakačim gumama. Antocijanini izolirani iz plodova koristili su se kao bojila za hranu (Zrira i sur., 2003).



Slika 3. *Pistacia lentiscus* (Anonymous 3, 2020)

2.3.1. Kemijski sastav tršlje

Rezultati kvantitativne analize kemijskog sastava tršlje utvrdili su prisutnost antocijana, leukoantocijana, tanina, flavonoida i terpenoida, a testovi na alkaloidne i steroide su negativni. Najznačajnije sastavnice eteričnog ulja su terpinen-4-ol (11,49%), germakren D (8,64%), alfa-pinen (5,97%), sabinen (5,19%), kariofilen (5,10%) i delta-kadinen (4,86%) (Mohamed i sur., 2018). Bouyahya i sur. (2019) proveli su istraživanje u kojem su identificirali 22 sastojka u eteričnom ulju tršlje. Glavne komponente eteričnog ulja lista su mircen (33,46%) i α -pinen (19,20%), a plodova α -pinen (20,46%) i limonen (18,26%).

Benhammou i sur. (2018) utvrdili su da eterično ulje tršlje ima dobra nutritivna svojstva zbog sadržaja nezasićenih masnih kiselina (70%) i zasićenih masnih kiselina (30%). Ulje je bogato oleinskom kiselinom (C18:1) i linolnom kiselinom (C18:2) koja je esencijalna masna kiselina značajna za ljudsko zdravlje (Mohand i sur., 2020).

2.3.2. Fenolni spojevi tršlje

Prema Zitouni i sur. (2016) najviše ukupnih fenola prisutno u listu tršlje ($216,29 \pm 20,62$ mg GAE/g). U stabljici je prisutno $121,40 \pm 3,35$ mg GAE/g, a u bobicama ($103,34 \pm 2,32$ mg GAE/g).

Botsaris i sur. (2015) ekstrahirali su fenolne spojeve iz bobica i lišća tršlja u različitim otapalima (butanol, aceton, metanol i voda). Rezultati su pokazali značajan udio flavonola pri čemu je njihov udio u plodovima iznosio od $8,00 \pm 0,10$ do $33,10 \pm 1,10$ mg RE/g ekstrakta, a u lišću od $20,10 \pm 1,10$ do $34,60 \pm 1,30$ mg RE/g ekstrakta. Prisutan je i visok udio derivata hidroksicimetnih kiselina, pri čemu je njihov udio u plodovima iznosio od $5,40 \pm 0,20$ do $22,20 \pm 0,80$ mg CAE/g (ekvivalent kafeinske kiseline), a u lišću od $8,40 \pm 0,30$ do $16,50 \pm 0,70$ mg CAE/g. Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da je lišće tršlje bogato fenolnim spojevima kao što su tanini i glukogalin (glukozid galne kiseline). Uspoređivanjem fenolnog sastava ekstrakata utvrđeno je da je metanolni ekstrakt najbogatiji fenolnim spojevima.

Prema rezultatima istraživanja Martić i Oguić (2018) od 11 fenolnih kiselina prisutnih u bobicama tršlje najzastupljenija je galna kiselina (59,25 mg/100 g uzorka). Iz skupine flavanola identificirani su procijanidin B1 (20,70 mg/100 g), procijanidin B2 (11,95 mg/100 g), katehin (18,55 mg/100 g), epigalokatehin galat (1,75 mg/100 g), epikatehin (18,30 mg/100 g) i epikatehin galat. Iz skupine flavona identificiran je luteolin u visokoj koncentraciji (1,55 mg/100 g) i apigenin (0,15 mg/100 g) čija je koncentracija najniža od svih fenolnih spojeva.

Najzastupljeniji spoj iz skupine flavonola, a ujedno i najzastupljeniji fenolni spoj u ekstraktima bobica je miricetin glukuronid (251,45 mg/100 g uzorka). Identificirani su i miricetin (14,65 mg/100 g), kvercetin-3-glukozid (56,60 mg/100 g) i kamferol-3-rutinozid (1,35 mg/100 g). Brojna istraživanja potvrđuju sličan fenolni profil i u listovima tršlje s iznimkom koncentracije galne kiseline koja je gotovo 10 puta veća u listovima nego u bobicama tršlje (Mehenni i sur., 2016).

2.3.3. Antioksidacijska aktivnost tršlje

Chryssavgi i sur. (2008) ispitali su antioksidacijsku aktivnost tršlje uz pomoć DPPH metode. Metanolni ekstrakti pokazali su dobru sposobnost hvatanja slobodnih radikala. IC50 vrijednost iznosi između 5,09 i 11,00 mg/L. IC50 vrijednost značajno ovisi o razdoblju berbe, a najmanja IC50 (najveća antioksidacijska aktivnost) 5,09 mg/mL izmjerena je kod tršlje koja je ubrana tijekom svibnja. Chryssavgi i sur. (2008) proveli su istraživanje i na mirti te su izmjerili IC50 vrijednosti između 9,54 i 17,10 mg/mL.

Sposobnost ekstrakata listova za hvatanje slobodnih radikala može se objasniti prisustvom bioaktivnih sastojaka kao što su fenolne kiseline (primjerice galna kiselina) i flavonoidi (derivati mircetina). Flavan-3-ol (katehin) prisutan je u malim količinama, ali također utječe na antioksidacijsku aktivnost (Umadevi i sur., 1988; Romani i sur., 2002). Utvrđeno je da derivati galne kiseline imaju visok učinak u hvatanju slobodnih radikala, dok kina kiselina nije pokazala antioksidativnu aktivnost (Baratto i sur., 2003). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala varira ovisno o vegetativnom stanju biljke. Te varijacije uvjetovane su količinom fenolnih sastojaka koji su prisutni u biljnom materijalu koji se bere. Najveći udio fenolnih sastojaka prisutan je u fazi cvjetanja i tada je antioksidacijska aktivnost najveća. Najniža antioksidacijska aktivnost ekstrakata tršlje dobivena je u veljači, što se može objasniti ograničenim stupnjem fotosinteze (Chryssavgi i sur., 2008).

Osim DPPH, provedena je FRAP metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti u metanolnim ekstraktima. Metanolni ekstrakti tršlje pokazali su značajnu sposobnost redukcije (84,60–131,40 mmol Fe²⁺/L biljnog ekstrakta). FRAP vrijednosti ovih ekstrakata značajno su veće od onih određenih u medicinskim biljnim infuzijama (Chryssavgi i sur., 2008). Njihova vrijednost je oko pet puta veća od FRAP vrijednosti matičnjaka (FRAP vrijednost veća od 20,00 i manja od 30,00 mmol Fe²⁺/L biljnog ekstrakta) (Katalinic i sur., 2006).

3. IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je učinkovit i brz postupak separacije i koncentriranja različitih sastojaka biljnog ili životinjskog podrijetla uz korištenje selektivnog otapala primjenom standardnih tehnika. Standardizacija ekstrakcijskih tehnika važna je iz razloga što pruža mogućnost dobivanja ekstrakata željenih terapijskih svojstava. Ekstrakcijom je omogućena separacija topljivih biljnih metabolita uz izdvajanje taloga kojeg čine netopljivi stanični sastojci. Dobiveni ekstrakti mogu se primjenjivati u obliku tinkture ili tekućeg ekstrakta, ali se mogu preraditi te inkorporirati u tablete ili kapsule. Iz ekstrakata se mogu izolirati i specifični kemijski spojevi što se koristi prilikom proizvodnje modernih lijekova. Na kvalitetu ekstrakta utječe odabir dijela biljke koji se koristio za pripremu ekstrakta, otapalo te korištena metoda ekstrakcije (Handa i sur., 2008.).

3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Režek Jambrak i sur. (2011) podijelili su konvencionalne metode ekstrakcije na: destilaciju, ekstrakciju otapalima i hladno prešanje. Za ekstrakciju eteričnog ulja iz biljnog materijala najčešće se primjenjuje destilacija i hladno prešanje (eterična ulja citrusa) dok se tekući ekstrakti bogati drugim isparivim izolatima dobivaju ekstrakcijom pomoću otapala (Handa i sur., 2008).

3.1.1. Ekstrakcija otapalima

Ekstrakcijom kruto-tekuće topljivi sastojci smjese odvajaju se od netopljivih ili manje topljivih sastojaka otapanjem u prikladnom otapalu. U prvoj fazi procesa dolazi do miješanja biljnog materijala i otapala u jednom ili nekoliko stupnjeva. Zatim slijedi period mirovanja tijekom kojeg se odvija prijenos mase topljive tvari iz biljnog materijala u otapalo. Prilikom prijenosa mase u otapalu se otapa topljiva tvar, a zatim se smjesa otapala i otopljene tvari kreće od unutrašnjosti prema površini biljnog materijala što dovodi do disperzije otopljene tvari u cijelom volumenu otapala. Cilj perioda zadržavanja je efikasno otapanje topljive tvari te postizanje ravnoteže u koncentraciji željenog sastojka u otopini i biljnom materijalu. Nakon perioda zadržavanja otapalo se uklanja (Herceg, 2011).

Izbor otapala ovisi o vrsti i svojstvima sastojaka koji se žele izolirati (Režek Jambrak i Drmić, 2010). Korišteno otapalo trebalo bi imati što nižu točku vrelišta, ne smije biti reaktivno, njegova viskoznost treba biti što manja, treba biti sigurno za ljude i okoliš te stabilno na kisik, toplinu i svjetlo, a potrebno je uzeti u obzir i polarnost otapala. Također važno je da otapalo bude lako

dostupno i da je niske cijene (Albu i sur., 2004). Najčešće korištena otapala za pripremu ekstrakata su voda, metanol, etanol i etil-acetat (Chryssavgi i sur., 2008; Amensour i sur., 2010; Tuberoso i sur., 2010). Nakon završetka ekstrakcije otapalo se uklanja uz pomoć grijanja, otparavanjem, destilacijom ili nekom drugom prikladnom metodom (Režek Jambrak i Drmić, 2010).

Ekstrakcija otapalima kod izolacije biljnih ekstrakata najčešće se provodi kao maceracija, infuzija ili Soxhlet ekstrakcija.

MACERACIJA

Maceracija je postupak dobivanja tekućih ekstrakata na način da se odgovarajuće ustinjeni biljni materijal ostavi određeno vrijeme u polarnom ili nepolarnom otapalu bez primjene povišene temperature (provodi se na sobnoj temperaturi ili na hladnom). Vrijeme maceracije i vrsta otapala ovise o biljnoj vrsti koja je uzeta za pripremu ekstrakcije, a može biti od nekoliko sati pa do nekoliko tjedana. Po potrebi se ekstrakt povremeno miješa. Nakon toga, ekstrakt se odvaja od biljnog materijala i pročišćava filtracijom. Biljni materijal koji se koristi može biti u obliku grubog praha, ali se nikada ne primjenjuje fini prah zbog otežanog pročišćavanja ekstrakata. Bolja učinkovitost postiže se dvostrukom maceracijom pri čemu je moguće izolirati veći udio bioaktivnih spojeva. Maceracija se najčešće provodi s ciljem dobivanja tinktura, alkoholnih ekstrakata biljnih droga dobivenih maceracijom u smjesi etanola i vode (Dragović-Uzelac, 2019; Handa i sur., 2008).

INFUZIJA

Infuzija (ili na hrvatskom jeziku čaj) je postupak kojim se mogu dobiti tekući ekstrakti. Dijelovi biljke koji se koriste za pripremu infuza su listovi, cvjetovi ili čak cijeli nadzemni dio biljke. Osušeni biljni materijal se usitnjava u grubi prah i stavlja u posudu s vodom zagrijanu na temperaturu vrenja. Posuda se poklopi i ostavi stajati između 5 i 15 min. Nakon toga smjesa se ocijedi kako bi se talog odvojio od tekućine. Bioaktivne tvari ekstrahiraju se uz pomoć vruće vode kojom je preliven biljni materijal. Ukoliko kipuća voda negativno djeluje na aktivnost izoliranih sastojaka infuzija se može provoditi i sa hladnom vodom (Dragović-Uzelac, 2019; Handa i sur., 2008).

SOXHLET EKSTRAKCIJA

Jedna od najčešće korištenih metoda ekstrakcije je ekstrakcija po Soxhletu. Glavni dijelovi Soxhlet aparature su tikvica, ekstrakcijska komora i hladilo (Hewavitharna i sur., 2020). U prvom koraku Soxhlet ekstrakcije otapalo se zagrijava na temperaturu vrenja. Nakon toga se kondenzira u hladilu i propušta kroz homogenizirani i usitnjeni uzorak biljnog materijala koji je smješten u naprstrku za ekstrakciju te se zajedno sa ekstraktom vraća u tikvicu (Drljača i Mrđa, 2009).

Glavne mane ove ekstrakcijske tehnike su velika potrošnja organskih otapala što dovodi do zagađenja okoliša, dugo trajanje procesa i mogućnost razgradnje spojeva koji su nestabilni na temperaturi vrenja otapala. Upotrebom automatske Soxhlet ekstrakcije troši se manje otapala, ali je proces i dalje dugotrajan, a volumen otapala i dalje velik (Drljača i Mrđa, 2009).

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA LOVORA KORIŠTENJEM METODA MACERACIJE I INFUZIJE
(Dias i sur., 2014a; 2014b)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Kultivirani uzorci lišća lovora prikupljeni su iz portugalske regije Castro Daire i regije Braganca i kasnije liofilizirani. Svi uzorci su usitnjeni u fini prah i skladišteni pri temperaturi 7 °C.

Ekstrakcija maceracijom: Svaki uzorak biljnog materijala (oko 1 g) miješan je s 30 mL metanola, pri sobnoj temperaturi, s brojem okretaja 150/min u trajanju od 1 h. Ekstrakt je filtriran uz pomoć filter papira. Talog je zatim reekstrahiran s dodatnih 30 mL metanola. Ta dva ekstrakta pomiješana su u jedan zbirni ekstrakt.

Ekstrakcija infuzijom: Svaki uzorak biljnog materijala (oko 1 g) dodan je u 200 mL kipuće destilirane vode i uzorci su ostavljeni stajati 5 min, uklonjeni od izvora topline, a zatim su filtrirani pri sniženom tlaku. Dobiven ekstrakt sušen je postupkom liofilizacije.

Određivanje sadržaja flavonoida: Flavonoidi su određeni HPLC metodom i identificirani prema njihovom UV i masenom spektru, retencijskim vremenima i usporedbom sa standardima.

REZULTATI

Fenolni spojevi ispitivanih uzoraka pripadaju skupini flavonoida, tj. flavan-3-olima, flavonolima i flavonima. Najzastupljenija skupina su flavan-3-oli i njihova koncentracija iznosi $63,60 \pm 0,40$ mg/g u maceratu i $52,00 \pm 5,00$ mg/g u infuziji. Sadržaj flavona iznosi je $4,00 \pm 1,00$ mg/g u maceratu i $3,00 \pm 1,00$ mg/g u infuziji. Sadržaj flavonola iznosi $19,00 \pm 10,00$ mg/g u maceratu i $15,00 \pm 9,00$ u infuziji.

Svi spojevi su prisutni u manjoj koncentraciji u ekstraktu dobivenom infuzijom što je posljedica odabira otapala, primjene više temperature te kraćeg trajanja procesa.

KLASIČNA EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE (Dahmoune i sur., 2014)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Lišće tršlje prikupljeno je u lipnju 2012. s područja sjevero-istočnog Alžira. Prikupljeni uzorci oprani su u pitkoj i destiliranoj vodi, sušeni u statičkoj peći na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ oko tjedan dana i nakon toga usitnjeni uz pomoć električnog mlinca. Prah je prosijan kroz sito promjera otvora $125\text{ }\mu\text{m}$ i skladišten u tamnom prostoru u hermetički zatvorenim vrećicama.

Ekstrakcija: Za konvencionalnu ekstrakciju otapalima, 1 g finog praha prenesen je u tikvicu s ravnim dnom (250 mL) te je dodano 50 mL 60% etanola. Smjesa je potom stavljena u vodenu kupelj s brojem udara 110/min, temperature $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, u trajanju od 2 h.

Određivanje ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i kondenziranih tanina: Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteuovom metodom. Apsorbancija je izmjerena pri 725 nm. Koncentracija se izražava kao mg ekvivalenta galne kiseline po g suhog materijala. Flavonoidi su određeni spektrofotometrijskom metodom s AlCl_3 pri valnoj duljini od 415 nm. Njihova koncentracija izražava se kao ekvivalent kvercetina po g suhog materijala. Tanini su određeni spektrofotometrijskom PVPP (polivinil polipirrolidon) metodom pri čemu je apsorbancija izmjerena na 550 nm.

REZULTATI

Prema rezultatima ovog istraživanja sadržaj ukupnih fenola iznosi $178,00 \pm 19,80$ mg GAE/g. Sadržaj ukupnih flavonoida iznosi je $4,79 \pm 0,03$ mg QE/g, a tanina $31,15 \pm 3,88$ mg/g.

Dahmoune i sur. (2014) usporedili su sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i tanina dobiven klasičnom ekstrakcijom sa sadržajem navedenih spojeva koji je dobiven primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Koncentracije ukupnih fenola iznosile su $185,69 \pm 18,35$ mg GAE/g kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i $142,76 \pm 19,98$ kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Koncentracije ukupnih flavonoida iznosile su $5,16 \pm 0,22$ mg QE/g kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, odnosno $4,61 \pm 0,02$ kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Koncentracije kondenziranih tanina iznosile su $40,21 \pm 1,76$ mg/g kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, odnosno $35,94 \pm 1,13$ mg/g kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Kao najučinkovitija metoda s najvećim koncentracijama pokazala se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

3.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije

Iako se ekstrakcija najčešće provodi primjenom konvencionalnih metoda, to donosi i određene mane. Pri takvom načinu ekstrakcije izdvaja se i velik broj interferirajućih spojeva što dovodi do smanjenja čistoće i kvalitete ekstrakta pa je u tom slučaju potrebno primijeniti različite metode pročišćavanja (Ignat i sur., 2011). Također, konvencionalne metode mogu uzrokovati razgradnju temeljnih sastojaka zbog primjene visokih temperatura i dugotrajnog vremena ekstrakcije (Drljača i Mrđa, 2009). Kako bi se zadovoljila potreba za smanjenjem onečišćenja okoliša koju uzrokuju organska otapala, štednjom energije i manjim troškovima konvencionalne metode ekstrakcije sve se više zamjenjuju novim tehnikama (Raynie, 2006).

Najčešće korištene nekonvencionalne tehnike ekstrakcije su ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE).

3.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima zauzima sve veći značaj u prehrambenoj i kemijskoj industriji zbog minimalnog utroška energije i značajnog poboljšanja kvalitete proizvoda. Glavni poticaji razvoju ekstrakcije superkritičnim fluidima bili su strogi zakoni o kontroli zagađenja okoliša, povećana cijena energije, svjesnost potrošača o upotrebi kemijskih otapala u prehrambenoj industriji te zahtjevi za dobivanjem proizvoda visoke kvalitete. Superkritično područje za ugljikov dioksid nalazi se iznad vrijednosti kritičnog tlaka (7,3 MPa) te iznad vrijednosti kritične temperature (31 °C). U tom području komprimirani plin naziva se superkritičnim fluidom i ima

karakteristike i tekućine i plina. Takvo otapalo pokazuje svojstva tekućeg otapala, a također posjeduje i svojstva plina, tj. ima malu viskoznost i dobru sposobnost difuzije (Herceg, 2011).

Osnovnu aparaturu ekstraktora za ekstrakciju superkričnim fluidima čine: posuda za ekstrakciju, posuda za separaciju, kondenzor i visokotlačna pumpa. Tekući CO₂ nalazi se u kondenzoru i uz pomoć pumpe se pumpa u posudu za ekstrakciju kroz izmjenjivač topline. Kontroliranjem tlaka i temperature dobiva se željeni oblik CO₂ u ekstraktoru. Plinovitim CO₂ pročišćava se biljni materijal koji se izolira, zatim se pumpa tekući CO₂ brzinom koja omogućuje prikladno vrijeme zadržavanja. Nakon toga otapalo se odvodi u posudu za separaciju, CO₂ se vraća u kondenzor, a ekstrakt se uklanja iz posude za separaciju (Herceg, 2011).

Prednost ovog načina je što otapalo vrlo hlapljivo i lako se odvaja od topljive tvari, nezapaljivo je, netoksično, bakteriostatičko i povoljno (Herceg, 2011).

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA LOVORA PRIMJENOM SUPERKRITIČNOG CO₂ (Santoyo i sur., 2005)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Uzorci lovorova lista prikupljeni su tijekom rujna u španjolskoj pokrajini Murcia. Uzorci su osušeni i kriogeno mljeveni u struji ugljikovog dioksida. Prah je prosijan kroz sita odgovarajuće veličine kako bi veličina čestica iznosila između 250 i 500 μm. Uzorak je čuvan u bocama od smeđeg stakla pri temperaturi -20 °C.

Ekstrakcija: Ekstrakcija se provodila u pilot postrojenju (razvojno postrojenje) za ekstrakciju superkričnim fluidima u ekstrakcijskoj ćeliji od 285 mL. Frakcioniranje je postignuto koristeći 2 različita spremnika u kojima je moguće kontrolirati tlak i temperaturu. Ćelija za ekstrakciju napunjena je sa 60 g usitnjenog lovora i 90 g pročišćenog morskog pijeska. Ekstrakcija je provedena pri tlaku 250 bar, temperaturi 60 °C, s 4% etanolom kao dopuna, tlak u separatoru 1 iznosio je 100 bar, temperatura u separatoru 1 60 °C, a tlak u separatoru 2 20 bar i temperatura u separatoru 2 20 °C. Ekstrakcija je trajala 75 min i etanol je dodan u trenutku kada je postignut željen tlak. Svi ekstrakti čuvani su pod dušikom, na temperaturi -20 °C u mraku, a etanol je uklonjen uz pomoć rotacijskog otparivača pri 35 °C.

Određivanje ukupnih fenola: ukupni fenoli izraženi su kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/g), a određeni su metodom po Folin-Ciocalteu, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 760 nm.

REZULTATI

U ovom istraživanju ekstrakcija se provodila u dva stupnja pri čemu se dobiju dvije frakcije sa različitom biološkom aktivnosti i kemijskim sastavom, tj. različitom količinom ukupnih fenolnih spojeva. Glavna razlika između frakcije 1 i 2 je primjenjen tlak u separatorima 1 i 2. Iz frakcije 1 izolirano je manje ukupnih fenolnih spojeva ($51,60 \pm 0,98$ mg GAE/g), dok je iz frakcije 2 izolirano $87,38 \pm 1,32$ mg GAE/g.

Uspoređujući rezultate istraživanja s rezultatima koje su dobili Dias i sur. (2014a; 2014b) primjenjujući metode maceracije i infuzije vidljivo je da se primjenom ekstrakcije superkričnim CO₂ u dva stupnja i maceracije izolirala podjednaka količina fenolnih spojeva. Nešto manja koncentracija ukupnih fenola izolirana je metodom infuzije, a razlog tome može biti odabir otapala, visoka temperatura i kratko vrijeme ekstrakcije.

3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi ulaze u interakcije sa dipolima polarnih materijala (i onima koji imaju sposobnost polarizacije) pri čemu dolazi do rotacije dipola i zagrijavanja polarnih molekula. U nepolarnim otapalima bez polarizirajućih grupa zagrijavanje je slabo, a toplinski učinak je praktički trenutnan, ali ograničen na malu površinu i djeluje samo na vanjski dio materijala (Handa i sur., 2008). Upotreba ekstrakcijskih metoda potpomognutih mikrovalovima prvotno se koristila u prehrambenoj industriji (Režek Jambrak i sur., 2011). Komercijalno dostupni sustavi ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi pri čemu tlak bitno ovisi o količini i vrelištu otapala, te pri atmosferskom tlaku u mikrovalnim pećnicama (Kaufmann i Christen, 2002; Cravotto i sur., 2008).

Ova metoda ekstrakcije djelotvornija je od konvencionalnih metoda, a njene glavne prednosti su kratko trajanje postupka, mala količina potrebnog otapala, potpuna kontrola parametara ekstrakcije, a biljni materijal nije potrebno sušiti (u uzorku smije biti prisutna voda). Glavni nedostaci ove metode su potreba za naknadnim pročišćavanjem ekstrakta, ograničen izbor otapala (potrebno birati polarna otapala) i relativno visoka cijena aparature (Nerin i sur., 2012).

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA MIRTE PRIMJENOM MIKROVALOVA (Dahmoune i sur., 2015)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Lišće je prikupljeno s područja sjevero-istočnog Alžira. Prikupljeno lišće sušeno je u peći s cirkulacijom zraka na 40 °C do konstantne mase te nakon toga usitnjeno uz pomoć električnog mlinca. Usitnjeni prah prosijan je kroz sito (125 µm) te je čuvan u hermetičkoj ambalaži na temperaturi 4 °C.

Ekstrakcija pomognuta mikrovalovima: Fenolni spojevi iz praha ekstrahirani su korištenjem kućne mikrovalne pećnice. Aparatura je opremljena digitalnim kontrolnim sustavom koji kontrolira vrijeme zračenja i snagu mikrovalova. Ekstrakcijski parametri su snaga mikrovalova (400-600 W), vrijeme ekstrakcije (30-90 sekundi), omjer otapalo : uzorak (20-40 mL/g) te koncentracija etanola (20-100 %). Nakon tretmana mikrovalovima, ekstrakt je filtriran uz pomoć filter papira i Buchnerovog lijevka i supernatant je pohranjen u volumetrijsku tikvicu. Ekstrakt je čuvan na temperaturi 4 °C.

Određivanje ukupnih fenola, flavonoida i tanina: Ukupni fenoli određeni su Folin-Ciocalteuovom metodom, a apsorbanacija uzorka se mjeri pri 760 nm. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva izražava kao ekvivalent galne kiseline (GAE). Flavonoidi su određeni spektrofotometrijskom metodom s AlCl₃ pri valnoj duljini od 415 nm, a njihova koncentracija izražava se kao ekvivalent kvercetina (QE). Tanini su određeni spektrofotometrijskom PVPP metodom pri čemu se apsorbanacija mjeri na 550 nm.

REZULTATI

Koncentracija fenolnih sastojaka raste sa porastom koncentracije etanola u ekstrakcijskom mediju; sve do 40%. Daljnjim porastom koncentracije etanola (do 60%) dolazi do pada koncentracije ukupnih fenolnih sastojaka. Visoka koncentracija etanola može uzrokovati denaturaciju proteina što sprječava otapanje polifenola te na taj način smanjuje iskorištenje ekstrakcije.

Utjecaj snage mikrovalova određen je pri vrijednostima između 300 i 900 W pri čemu su koncentracija otapala, vrijeme zračenja i omjer otapalo : uzorak održavani konstantnima. Značajan porast koncentracije ukupnih fenola sa 134,63 na 152,25 mg GAE/g dobiven je primjenjujući snagu vrijednosti 400 do 500 W. Koncentracija fenolnih spojeva se značajno

smanjuje pri vrijednostima iznad 600 W, a najmanja je dobivena pri 900 W (129,95 mg GAE/g). Smanjenje koncentracije ukupnih fenola iznad snage od 600 W može se objasniti termalnom razgradnjom fitokemikalija u biljnom materijalu zbog visoke temperature generirane mikrovalovima.

S povećanjem vremena zračenja, količina ekstrahiranih analita će porasti, iako postoji rizik od razgradnje ekstrahiranih komponenti. U ovom istraživanju koncentracija ukupnih fenola određena je tijekom različitih vremena zračenja (30 – 210 sekundi) uz konstantne ostale parametre. Rezultati upućuju na to da je najveća koncentracija izoliranih sastojaka prisutna nakon 60 sekundi (159 mg GAE/g), a opada nakon 90 sekundi.

Koncentracija ukupnih fenola raste s porastom omjera otapalo : uzorak. Najviša koncentracija utvrđena je pri omjeru 30:1 mL/g.

Optimizacijom procesa utvrđeno je da se najviša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva dobila primjenjujući sljedeće parametre: vrijeme ekstrakcije 1,04 min, koncentracija etanola 42%, snaga mikrovalova 500 W i omjer otapalo : uzorak 32 mL/g. U tim uvjetima koncentracija ukupnih fenolnih spojeva biti će $162,49 \pm 16,95$ mg GAE/g, ukupnih flavonoida $5,02 \pm 0,05$ mg QE/g, a kondenziranih tanina $32,65 \pm 0,01$ mg/g.

Dahmoune i sur. (2015) odredili su fenolni sastav lišća mirte primjenom klasične ekstrakcije i prema njihovim rezultatima koncentracija ukupnih fenola iznosila je $128,00 \pm 18,07$ mg GAE/g. Primjenjujući ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima moguće je izolirati puno veći udio fenolnih spojeva u puno kraćem vremenu.

3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Zvučni val karakteriziran je svojom valnom duljinom, varijabilnom frekvencijom, amplitudom i koeficijentom prigušenja (Režek Jambrak i Drmić, 2010). Longitudinalni valovi koji nastaju prolaskom vala kroz biljni materijal stvaraju područja promjenjivih ekspanzija i kompresija tlaka, pri čemu nastaje veliki broj mikroskopskih kavitacijskih mjehurića. Uslijed djelovanja negativnog tlaka oni se šire, a zatim se naglo kompresiraju (urušavaju se u sebe) pod utjecajem pozitivnog tlaka. Kod frekvencija iznad 1 MHz mala je vjerojatnost pojave kavitacija, dok iznad 2,5 MHz do njih uopće ne dolazi (Sala i sur., 1995, Povey i Mason, 1998). Ultrazvuk visoke snage uslijed djelovanja kavitacije na staničnu stjenku dovodi do bolje penetracije otapala u materijal pri

čemu se povećava prijenos mase. Na taj način ubrzava se ekstrakcija i povećava se njena učinkovitost (Režek Jambrak i Drmić, 2010).

Prednosti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije su njena jednostvanost, kratko vrijeme ekstrakcije, korištenje male količine otapala, a moguće ju je lako uklopiti i povezati s ostalim ekstrakcijskim tehnikama. Kako se ekstrakcija provodi na sobnoj temperaturi, smanjena je vjerojatnost oksidacije i razgradnje značajnih bioaktivnih sastojaka (Louie i sur., 2020). Tehnologija ultrazvučne ekstrakcije može se jednostavno povezati sa procesima minimalnog procesiranja hrane te omogućuje zamjenu organskih otapala s vodom ili nekim drugim otapalom koje je opće priznato kao sigurno za ljude i okoliš (Režek Jambrak i Drmić, 2010).

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA MIRTE PRIMJENOM ULTRAZVUKA (Bouaoudia-Madi i sur., 2019)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Bobice mirte prikupljene su sa područja sjevero-istočnog Alžira. Bobice su oprane te sušene u statičkoj pećnici na 40 °C tjedan dana. Perikarp je odvojen od sjemenki zatim usitnjen uz pomoć električne mješalice i prosijan kako bi se dobio prah veličine čestica <250 µm.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom: Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodila se u ultrazvučnoj aparaturi sa radnom frekvencijom podešenom na 20 kHz. 1 g usitnjenog perikarpa nanesen je u bocu od smeđeg stakla (250 mL) koja sadrži etanol. Suspenzija je izložena zvučnim valovima uz određene parametre (koncentracija otapala, vrijeme zračenja, ultrazvučna amplituda i omjer otapalo : uzorak). Temperatura je održavana konstantnom. Nakon ekstrakcije otopina je filtrirana kroz porozni stakleni filter.

Određivanje ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i kondenziranih tanina: Ukupni fenolni sastav određen je Folin-Ciocalteu metodom i izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/g). Ukupni sadržaj flavonoida određen je spektrometrijskom metodom s AlCl₃ i izražen je kao ekvivalent kvercetina (mg QE/ g). Ukupni antocijani određeni su pH diferencijalnom metodom i izraženi su kao ekvivalent cijanidin-3-O-glukozida po gramu praha. Kondenzirani tanini određeni su primjenom HCl – vanilin metode i rezultati su izraženi kao ekvivalent katehina.

REZULTATI

Porastom koncentracije etanola s 20 na 80% ili vremena ekstrakcije s 5 na 10 minuta dolazi do značajnog porasta koncentracija ukupnih fenolnih sastojaka, pri čemu je najviša koncentracija iznosila 235,21 mg GAE/g kod koncentracije etanola 70% i trajanja zračenja 7,5 min. Takav visok sadržaj ukupnih fenola ukazuje da smjesa etanola i vode pri koncentraciji etanola 70% omogućuje dobro otapanje fenola iz perikarpa mirte što se može objasniti poboljšanjem hidratacije i fragmentacije što olakšava prijenos mase iz otopljene tvari u otapalo.

Pri konstantnom vremenu ekstrakcije i omjeru otapalo : uzorak, najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iznosila je 210,05 mg GAE/g, a ona je postignuta koristeći 70 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo pri ultrazvučnoj amplitudi od 35%. Veća amplituda ultrazvučnih valova dovodi do nastanka većeg broja kavitacijskih mjehurića, što rezultira snažnim pritiskom koji uništava stanične stijenke i ubrzava prijenos mase.

Visoka koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (230,15 mg GAE/g) vidljiva je kod koncentracije etanola 70% te omjera otapalo : uzorak oko 30 mL/g (uz konstantno vrijeme i amplitudu). S većim omjerom otapalo : uzorak veća je koncentracijska razlika između otapala i tkiva perikarpa što potiče ubrzano otapanje fenolnih spojeva, a posljedično je ekstrakcijsko iskorištenje veće.

Kod omjera otapalo : uzorak 30 mL/g i vremenu ekstrakcije u trajanju od 10 min (uz konstantne ostale parametre) koncentracija ukupnih fenola iznosila je 148,00 mg GAE/g).

Optimizacijom procesa utvrđeno je da se najveći udio fenolnih spojeva može izolirati pri sljedećim parametrima: koncentracija etanola 70%, vrijeme ekstrakcije 7,5 min, amplituda ultrazvučnih valova 30% i omjer otapalo : uzorak 28 mL/g. U tim uvjetima koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iznosi $241,66 \pm 12,77$ mg GAE/g, flavonoida $18,99 \pm 1,31$ mg QE/g, antocijanidina $25,06 \pm 0,36$ mg/g te tanina $35,56 \pm 0,36$ mg CE/g.

Isti tim znanstvenika odredio je fenolni sastav bobica mirte dobiven primjenom klasične metode ekstrakcije. Primjenom klasične ekstrakcije dobio se ekstrakt u kojem je koncentracija ukupnih fenola iznosila $76,40 \pm 7,27$ mg GAE/g što je puno manje u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Osim boljeg fenolnog sastava ekstrakta, prednost ultrazvukom potpomognute ekstrakcije je puno kraće trajanje postupka.

3.2.4. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*)

Za razliku od klasičnih tehnika koje mogu biti izrazito dugotrajne i umarajuće, ASE je u potpunosti automatizirana i te se zato često primjenjuje u rutinskim analizama okolišnih kontaminanata i hrane (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). Povišena temperatura ubrzava odvijanje ekstrakcije, a visoki tlak omogućava brže punjenje ekstrakcijske ćelije i brži prijenos mase pri čemu otapalo ostaje u tekućem stanju (Handa i sur., 2008). ASE uređaj za ekstrakciju prikazuje Slika 4.

Glavne prednosti ASE sustava su kratko vrijeme ekstrakcije u trajanju od oko 15 min, upotreba male količine otapala te brza i jednostavna priprema uzoraka i rukovanje uređajem. Moguće je koristiti velik broj različitih otapala (uz izuzetak jakih kiselina i lužina te otapala zapaljivih pri temperaturama od 40 do 200 °C), a isto tako otapala se mogu koristiti u obliku čistih otapala ili kao smjesa više njih. ASE je relativno nova tehnika i njena upotreba ograničena je zbog njene visoke cijene i potrebe za dodatnim pročišćavanjem ekstrakata prije analiza (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).



Slika 4. ASE uređaj (Anonymous 5, 2012)

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA MIRTE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA I ODREĐIVANJE ANTIKANDIDNE AKTIVNOSTI (Erdogan i sur., 2014)

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal: Lišće mirte prikupljeno je u svibnju u Mersinu (Turska).

Priprema ekstrakata: Ekstrakcija topljivih komponenti mirte provodila se uz metanol, etanol, aceton i etil acetat kao otapala. Uzorci lišća (2,4 g) samljeveni su u blenderu i prosijani kroz sito kako bi veličina čestica bila manja od 2 mm te pomiješani s dijatomejskom zemljom (omjer 1:1) kako bi se uklonila zaostala vlaga. Uzorci su zatim stavljeni u ćeliju za ekstrakciju od 66 mL izrađenu od nehrđajućeg čelika. Osušeni uzorci (2,4 g) ekstrahirani su u jednom ciklusu sa svim otapalima (99%-tne čistoće) pri temperaturi 100°C i tlaku 1500 psi tijekom 5 min. Nakon toga, ćelija je isprana ekstrakcijskim otapalom i pročišćena protokom dušika (150 psi, 90 s). Ekstrakcijska otopina prikupljena je u staklene bočice volumena 66 mL. Ovaj postupak odvojeno se ponavljao za svako otapalo. Ekstrakti su filtrirani i pohranjeni na temperaturu -20°C u tamnom prostoru.

HPLC analiza: Ukupno vrijeme analize trajalo je 45 min, a korištena otapala su acetonitril i razrijeđena fosforna kiselina. Protok otapala je 20 ml/min, a injektirani volumen 20 µl. Analiza je provedena pri valnoj duljini 280 nm.

Antikandidna aktivnost: Ekstrakti mirte testirani su protiv *Candida albicans* određivanjem MIC (Minimal Inhibitory Concentration) i MFC (Minimum Fungicidal Concentration). MIC, tj. minimalna inhibitorna koncentracija, predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa kojom se inhibira vidljiva proliferacija organizama, a MFC, tj. minimalna fungicidna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju koja ubija 99,9% stanica.

REZULTATI

Acetonski ekstrakt pokazao je najveću aktivnost protiv *C. albicans* s MIC vrijednosti 0,19 i MFC vrijednosti 0,38 mg/mL. Glavna komponenta acetonskog ekstrakta je galna kiselina (2,42 mg/g). Metanolni ekstrakt pokazao je najnižu aktivnost (MIC: 1,50 mg/mL i MFC: 3,00 mg/mL), a glavna komponenta metanolnog ekstrakta je kvercetin (2,29 mg/g). Ferulinska kiselina prisutna je u malim koncentracijama u metanolnom (0,02 mg/g), etanolnom (0,04 mg/g) i etil acetatnom (0,01 mg/g) ekstraktu, dok u acetonskom ekstraktu nije utvrđena. Ovim istraživanjem utvrđeno je da svi ekstrakti izolirani primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pokazuju snažnu antikandidnu aktivnost.

4. ZAKLJUČAK

- Mirta, tršlja i lovor bogat su izvor fenolnih spojeva.
- Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u listu mirte kreće se od $346,89 \pm 7,56$ do $714,33 \pm 4,69$ mg GAE/g ovisno o ekstrakcijskom otapalu, dok u sjemenkama ploda iznosi $566,00$ mg/100g.
- U listu tršlje prisutno je najviše ukupnih fenola ($216,29 \pm 20,62$ mg GAE/g), zatim u stabljici ($121,40 \pm 3,35$ mg GAE/g) te u bobicama ($103,34 \pm 2,32$ mg GAE/g).
- Udio ukupnih fenolnih spojeva lovorova lista kreće se od $22,90$ mg GAE/g do $80,30$ mg GAE/g ovisno o fenotipskoj fazi biljke.
- Različita ekstrakcijska otapala ekstrahiraju različit udio ukupnih fenolnih spojeva. Metanol se pokazao najboljim otapalom kod izolacije fenolnih spojeva tršlje, etanol kod mirte i etil acetat kod lovora.
- Mnoga *in vitro* istraživanja utvrdila su da fenolni spojevi kao što su flavonoidi i fenolne kiseline pokazuju antioksidativnu aktivnost, a ta aktivnost ovisi o broju i položaju fenolnih hidroksilnih skupina u aromatskom prstenu. Iz tog razloga antioksidacijska aktivnost značajno je povezana sa ukupnim sadržajem fenolnih spojeva u ekstraktima ovih biljaka.
- Nove nekonvencionalne tehnike ekstrakcije sve se više koriste u izolaciji biološki aktivnih spojeva zbog štednje energije, štednje otapala, zaštite okoliša i bolje kvalitete ekstrakta. Najveća koncentracija fenolnih spojeva izolirana je iz bobica mirte primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ($241,66 \pm 12,77$ mg GAE/g), što je puno više od koncentracije spojeva izoliranih klasičnom ekstrakcijom ($76,40 \pm 7,27$ mg GAE/g). Vrlo visoke koncentracije izoliranih spojeva dobivaju se i primjenom ekstrakcije potpomognutom mikrovalovima (ekstrakt lista mirte sadrži $162,49 \pm 16,95$ mg GAE/g, dok ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom sadrži $128,00 \pm 18,07$ mg GAE/g). Uz odabire parametara, bitan utjecaj na koncentraciju izoliranih spojeva ima dio biljnog materijala koji se koristio za ekstrakciju.

5. POPIS LITERATURE

1. Aidi Wannas W. A., Mhamdi B., Sriti J., Jemia M. B., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M. E., Marzouk B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 1362 – 1370.
2. Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J. P., Mason T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 261 – 265.
3. Aleksic V., Knezevic P. (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological research* **169**: 240 – 254.
4. Amensour M., Bouhdid S., Fernandez-Lopez J., Idaomar M., Senhaji N. S., Abrini J. (2010) Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Properties* **13**: 1215 – 1224.
5. 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 Communication* **4**: 819 – 824.
6. Anonymous 1 (2020) <https://it.wikipedia.org/wiki/Laurus_nobilis>, Pristupljeno: 9. kolovoza 2020.
7. Anonymous 2 (2020) <http://www.wikiwand.com/it/Myrtus_communis>, Pristupljeno: 9. kolovoza 2020.
8. Anonymous 3 (2020) <<https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/11/trslja-4.jpg>>, pristupljeno 30. kolovoza 2020
9. Anonymous 4 (2020) Tršlja – *Pistacia lentiscus* <<https://www.plantea.com.hr/trslja>> Pristupljeno 25. srpnja 2020.
10. Anonymous 5 (2012) <<https://analyteguru.com/accelerated-solvent-extraction-on-demand-webinar-and-faq/>>, Pristupljeno: 9. kolovoza 2020.

11. Appendino G., Bianchi F., Minassi A., Sterner O., Ballero M., Gibbons S. (2002) Oligomeric acylphloroglucinols from myrtle (*Myrtus communis*). *Journal of Natural Products* **65**: 334 – 338.
12. 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* **37**: 405–412.
13. Baytop T. (1999) Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present), Istanbul: Nobel Medical Press.
14. Benhammou N. B., Belyagoubi L., Belaskri A. E., Zitouni A., Ghembaza N., Benhassaini H., Atik-Bekkara F., Piras A., Falconieri D., Rosa A. (2018) Fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. fruit fatty oil from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization* **12**: 1408 - 1412.
15. Benhammou N., Bekkara F. A., Panovska T. K. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 22 - 28.
16. Botsaris G., Orphanides 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**: 472 – 478.
17. Bouaoudia-Madi N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K., Silva A. M. S., Dairi S., Oukhmanou-Bensidhoum S., Cardoso S. M. (2019) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Pericarp. *Antioxidants (Basel)* **8**: 205.
18. Bouyahya A., Christelle Chadon Assemian I., Mouzount H., Bourias I., Et-Touys A., Fella H., Benjouad A., Nadia D., Bakri Y. (2019) Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs? *Industrial Crops and Products* **128**: 62 – 69.
19. Chalchat J. C., Garry R. F., Michet A. (1998) Essential oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *Journal of Essential Oil Research* **10**: 613 – 617.

20. Chryssavgi G., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., Michael K. (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* **107**: 1120 – 1130.
21. Clark A. M. (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research* **13**: 1133 – 1144.
22. Conforti F., Statti G., Uzunov D., Menichini F. (2006) Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**: 2056 – 2064.
23. Corredu F., Maldini M., Addis R., Petretto G. L., Palomba M., Battacone G., Pulina G., Nudda A. (2019) *Myrtus Communis* Liquor Byproduct as a Source of Bioactive Compounds. *Foods* **8**: 325 – 329.
24. Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* **15**: 898– 902.
25. Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Khodir M. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* **166**: 585-595.
26. 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.
27. Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M. C., Stella L., Greco E., Innocenti G. (2009) Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *Journal of medicinal food* **12**: 869 – 876.
28. Derwich E., Benziane Z., Boukir A. (2009) Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**: 3818 – 3824.

29. Dias M. I., Barros L., Duenas M., Alves R. C., Oliveira M. B. P., Santos-Buelga C., Ferreira I. C. (2014a) Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food chemistry* **156**: 339–346.
30. Dias M. I., Barreira J., Calhelha R. C., Queiroz M. J. R., Oliveira M. B. P., Soković M., Ferreira I. C. (2014b) Two-dimensional PCA highlights the differentiated antitumor and antimicrobial activity of methanolic and aqueous extracts of *Laurus nobilis* L. from different origins. *BioMed research international* **2014**: 1 – 10.
31. Djilani A., Dicko A. (2012) The therapeutic benefits of essential oils. U: Nutrition, well-being and health, Bouayed J., ur., Nutrition, well-being and health, InTech, str. 155 – 178.
32. Dragović-Uzelac, V. (2019) Nastavni materijal iz modula Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
33. Drljača D. i Mrđa M. (2009) Ultrazvučna ekstrakcija epikatehina i procijanidina B2 iz čokolade, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
34. Duthie G., Crosier A. (2000) Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **3**: 447–51.
35. Elfellah M. S., Akhter M. H., Khan M. T. (1984) Antihyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **11**: 275 – 281.
36. Erdogan E. A., Goksen G., Everest A. (2014) Anti-candidal activities of some *Myrtus Communis* L. extracts obtained using accelerated solvent extraction (ASE). *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **2**: 12 -- 14.
37. Filipowicz N., Kamiński M., Kurlenda J., Asztemborska M. (2003) Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research* **17**: 227-231.
38. Fine (2000) Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review* **5**: 144–151.

39. Fraga B.M. (2003) Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports* **20**: 392 – 413.
40. Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł., Namieśnik J. (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples — some aspects of theory and practice. *Analytical Chemistry* **31**: 149 –165.
41. Gortzi O., Lalas S., Chinou I., Tsaknis J. (2008) Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European Food Research and Technology* **226**: 583 – 590.
42. Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D. (2008) Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International centre for science and high technology, Trieste.
43. Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, Prehrambeno – procesno inženjerstvo 1, Ekstrakcija, str. 98-103.
44. Hewavitharna G. G., Perera D. N., Navaratne S. B., Wickramasinghe I. (2020) Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry* **13**: 6865 – 6875.
45. Ignat I., Volf I., Popa V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821 - 1835.
46. Julianti E., Jang K. H., Lee S., Lee D., Mar W., Oh K., Shin J. (2012) Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. *Phytochemistry* **80**: 70 - 76.
47. Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* **94**: 550 – 557.
48. Kaufmann B., Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**: 105–113.
49. Kaurinovic B., Vastag G. (2019) Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. 10.5772/intechopen.83731.

50. Koji Y.K., Yamamoto T., Kawai Y., Inoue N. (2004) Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology* **21**: 283 - 289.
51. Konovalov D.A., Alieva N. M. (2019) Phenolic compounds of *Laurus nobilis* (Review). *Scientific and Practical Journal: Pharmacy and Pharmacology* **7**: 244 — 259.
52. Kuštrak D. (2005) Farmakognozija – fitofarmacija, str. 295 – 298.
53. Le Floch E. (1983) Contribution a une etude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* **31**: 129.
54. Louie K. B., Kosina S. M., Hu Y., Otani H., de Raad M., Kuffin A. N., Mouncey N. J., Bowen B. P., Northen T. R. (2020) Mass Spectrometry for Natural Product Discovery, *Comprehensive Natural Products III (Treće izdanje)*, Chemistry and Biology 6: str. 263 – 306.
55. Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A., Chinou I., Mitaku S. (1999) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Medica* **65**: 749 – 752.
56. Mahmoud I. N., El-Sayed A. A., Rania F. A., Ezzel-Din A., El-Khrisy Khaled M. I., Amany A. S. (2010) Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Research* **2**: 325 – 329.
57. Martić I., Oguić A. (2018) Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u izolaciji fenolnih spojeva bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i definiranje antioksidacijskog kapaciteta, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
58. Martin T., Villaescusa L., De Sotto M., Lucia A., Diaz A. M. (1990) Determination of anthocyanin pigments in *Myrtus communis* berries. *Fitoterapia* **61**: 85.
59. Mehenni C., Atmani-Kilani D., Dumarcay A., Perrin D., Gerardin P., Atmani D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**: 653 — 669.

60. Messaoud C., Laabidi A., Boussaid M. (2012) Myrtus communis L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Science* **77**: 941 – 947.
61. Messaoud C., Zaouali Y., Ben Salah A., Khoudja M. L., Boussaid M. (2005) Myrtus communis in Tunisia: variability of the essential oil composition in natural populations. *Flavour and Fragrance Journal* **20**: 577–582.
62. Mohamed K., Zine K., Fahima K., Abdelfattah E., Sharifudin S., Duduku K. (2018) NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of Pistacia lentiscus essential oil. *Toxicology reports* **5**: 480-488.
63. Mohand B. A., Antari A. E., Benkhalti F. (2020) Chemical Composition of Pistacia lentiscus Seeds' Oil from Moroccan High Atlas Mountain. *Journal of Food Quality* **2020**: 1-5.
64. Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* **72**: 145–171.
65. Mrmić L. (2020) Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku, Diplomski rad, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
66. Nassar M. I., Aboutabl E. A., Ahmed R. A., El-Khrisy E. A., Ibrahim K. M., Sleem A. A. (2010) Secondary metabolites and bioactivities of Myrtus communis. *Pharmacognosy Research* **2**: 325–329.
67. Nerin C., Domeño C., Salafranca J. (2012) Advances in Sample Preparation of Environmental Solid Matrices. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Analytical Techniques for Scientists 3, str. 783 - 796
68. Okuda T. (2000) Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* **66**: 2012–2020.
69. Oyedemi S. O., Okoh A.I., Mabinya L.V., Pirochenva G., Afolayan A.J. (2009) The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, A-terpineol and Y-terpinene

- against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* **8**: 1280–1290.
70. Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M. (2008) Investigation of the Antioxidant Behavior of Air- and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 5743– 5752.
71. Park H. J., Jung W. T., Basnet P., Kadota S., Namba T. (1996) Syringin 4-O-bglucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *Journal of Natural Products* **59**: 1128–1130.
72. Petkova Z., Stefanova G., Girova T., Antova G., Stoyanova M., Damianova S., Gochev V., Stoyanova A., Zheljazkov V. D. (2019) Phytochemical Investigations of Laurel Fruits (*Laurus nobilis*). *Natural Product Communications* **2019**: 1-10.
73. Pietta G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: 1035–1042.
74. Povey M. J. W., Mason, T. J. (1998) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic and Professional, London.
75. Pravilnik o postojećim tvarima 61 (2008) *Narodne Novine* **61** (NN 61/2008)
76. Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoeliso H. S., Raherimandimby M., Danthu P. (2009) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry* **114**: 680–684.
77. Raynie D.E. (2006) Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry* **78**: 3997–4004.
78. Režek Jambrak A. i sur. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3**: 32-47.
79. Režek Jambrak A., Drmić H. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2**: 22-33.

80. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **22**: 375–383.
81. Romani A., Coinu R., Carta S., Pinelli P., Galardi C., Vincieri F. F., Franconi F. (2004) Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radical Research* **38**: 97–103.
82. Romani A., Pinelli P., Galardi N., Mulinacci N., Tattini M. (2002) Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis* **13**: 79–86.
83. Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F. F., Tattini M. (1999) Identification and quantification of polyphenols in leaves of *Myrtus communis*. *Chromatographia* **49**: 17–20.
84. Sala F. J., Burgos J., Condon S., Lopez P., Raso J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New methods of Food Preservation*. Gould G. W., ur., Blackie Academic and Professional: London, str. 176 – 204.
85. Santoyo S., Lloría R., Jaime L., Ibanez E., Senor F. J., Reglero G. (2005) Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *European Food Research and Technology* **222**: 565–571.
86. Serce S., Ercisli S., Sengul M., Gunduz K., Orhan E. (2010) Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *Pharmacognosy Magazine* **6**: 9–12.
87. 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**: 806–811.
88. Tuberoso C. I. G., Rosa A., Bifulco E., Melis M. P., Atzeri A., Pirisi F. M., Dessì M. A. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry* **123**: 1242–1250.

89. Umadevi I., Daniel M., Sabnis, S. D. (1988) Chemotaxonomic studies on some members of Anardiaceae. *Proceedings: Plant Sciences* **98**: str. 205–208.
90. Yoshimura M., Amakura Y., Tokuhara M., Yoshida T. (2008) Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Journal of Natural Medicines* **62**: 366–368.
91. Zanetti S., Cannas S., Molicotti P., Bua A., Cubeddu M., Porcedda S., Marongiu B., Sechi L. A. (2010) Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdisciplinary Perspective of Infectious Diseases* **2010**: 1–4.
92. Zitouni A., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Toul F., AtikBekkara F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **8**: 627-633.
93. Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* **58**: 45–54.
94. Zrira S., Elamrani A., Benjilali B. (2003) Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco a seasonal variation. *Flavour and Fragrance Journal* **18**: 475-480.

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.

Lučija Dizdara

ime i prezime studenta