

Izolacija biološki aktivnih spojeva iz tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Jankov, Lea

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:159:486804>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Lea Jankov

7480/N

**IZOLACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH
SPOJEVA IZ TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

Zagreb, 2020.



Plant Biomolecules

Ovo istraživanje provedeno je u okviru 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.



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Izolacija biološki aktivnih spojeva iz tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Lea Jankov, 7480/N

Sažetak: Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je biljka koja je široko rasprostranjena u mediteranskim predjelima. Sadrži brojne strukturno različite skupine bioaktivnih molekula (BAM) od kojih, među značajnije, spadaju polifenoli te u eteričnim uljima prisutni monoterpeni i seskviterpeni. Bioaktivne molekule tršlje rasprostranjene su u gotovo svim dijelovima biljke kao što su listovi, plodovi, herba te korijen. Za izolaciju BAM važno je poznavati njihovu molekulsku strukturu, fizikalna i kemijska svojstva, a također je važno izabrati učinkovitu tehniku ekstrakcije te definirati optimalne uvjete pri kojima se postižu najveći prinosi. Stoga su ciljevi ovog rada bili: (i) prikazati pregled bioaktivnih molekula tršlje (ii) definirati sastavnice eteričnih ulja tršlje (iii) usporediti postupke ekstrakcije bioaktivnih molekula tršlje primjenom konvencionalnih i naprednih tehnika te (iv) opisati postupke izolacije eteričnih ulja.

Ključne riječi: eterična ulja, fenolni spojevi, konvencionalne tehnike ekstrakcije, napredne tehnike ekstrakcije, *Pistacia lentiscus* L.

Rad sadrži: 32 stranice, 10 slika, 72 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: Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Zoran Zorić

Datum obrane: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Isolation of bioactive compounds from *Pistacia lentiscus* L.

Lea Jankov, 7480/N

Abstract: Mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) is a plant species widely spread throughout the Mediterranean region. It contains numerous structurally various groups of the bioactive molecules (BAM), among which the most abundant are polyphenols and in essential oil presented monoterpenes and sesquiterpenes. Mastic tree bioactive molecules are distributed in almost all parts of the plant, such as leaves, fruits, herb and root. To choose an efficient extraction technique and to define the optimal conditions under which the highest yields of targeted BAMs are achieved it is important to know their molecular structure, physical and chemical properties. Therefore, the objectives of this paper were: (i) to present an overview of mastic tree bioactive molecules (ii) to define the composition of the mastic tree essential oils (iii) to compare conventional and advanced extraction technique of mastic tree bioactive molecules isolation (iv) to describe the methods of the essential oil isolation.

Keywords: advanced extraction technique, conventional extraction technique, essential oils, *Pistacia lentiscus* L., polyphenols

Thesis contains: 32 pages, 10 figures, 72 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. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD Zoran Zorić, Assistant Professor*

Defence date: July 10th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Morfološka i botanička obilježja tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	2
2.2. Upotreba tršlje	3
2.3. Fenolni spojevi tršlje	5
2.3.1. Fenolne kiseline	7
2.3.2. Flavonoidi	8
2.3.3. Ostali fenolni spojevi	10
2.4. Eterična ulja tršlje	11
2.5. Biološka svojstva ekstrakata i eteričnih ulja tršlje (fenoli i eterična ulja)	12
2.6. Postupci ekstrakcije fenolnih spojeva tršlje	14
2.6.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije	14
2.6.2. Napredne tehnike ekstrakcije	16
2.7. Postupci izolacije eteričnih ulja tršlje	20
2.7.1. Destilacija eteričnih ulja vodom, vodenom parom i parom	20
2.7.2. Ekstrakcija superkričnim fluidima	22
2.8. Pregled dosadašnjih istraživanja ekstrakcije bioaktivnih spojeva tršlje	24
3. ZAKLJUČAK	25
4. LITERATURA	26

1. UVOD

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) pripada grupi biljaka iz porodice Anacardiaceae, a najviše je rasprostranjena u mediteranskim područjima, dok u Republici Hrvatskoj najviše raste duž Jadranske obale te na otocima. Predmet je brojnih istraživanja zbog visokog sadržaja različitih skupina bioaktivnih molekula koje se nalaze u gotovo svim dijelovima biljke kao što su listovi, plodovi, herba ili cijeli nadzemni dio biljke te korijen. U tršlji su prisutne strukturno različite skupine bioaktivnih molekula, a jedna od najzastupljenijih skupina su polifenoli. Najzastupljeniji spojevi u listovima tršlje su polifenoli, posebice spojevi iz skupine flavonoida (kvercetin i njegovi derivati te derivati miricetina), hidroksicimetnih kiselina (klorogenska kiselina, p-kumarinska-4-O-glukozid i kafeoilkina kiselina) te galna kiselina i njezini derivati. Navedeni spojevi naročito su važni jer imaju izrazita antioksidativna, antimikrobna, protuupalna i brojna druga pozitivna djelovanja.

Tršlja također sadrži manji udio eteričnih ulja koji čine smjese kemijskih spojeva za koje je dokazano da posjeduju antibakterijska, antifungalna, antiviralna i druga svojstva, a sastav eteričnih ulja ovisi o kemotipu. Neke od značajnijih sastavnica eteričnih ulja tršlje su monoterpeni (α -pinen, β -pinen, β -mircen, limonen, terpinen-4-ol) i seskviterpeni (β -kariofilen, germakren D, γ -kadinen). Tršlja se zbog zanimljivog i bogatog sastava smatra vrlo pogodnom za proizvodnju biljnih ekstrakata te također za izolaciju eteričnih ulja. Za izolaciju bioaktivnih molekula iz tršlje važno je dobro poznavati njihovu molekulsku strukturu, fizikalna i kemijska svojstva, a za dobivanje ekstrakata i eteričnih ulja s visokim prinosima bioaktivnih molekula važan je izbor metode ekstrakcije te definiranje optimalnih uvjeta (temperatura, vrijeme, izbor otapala, odabir tehnike ekstrakcije, pH, veličina čestica itd.) pri kojima se dobivaju visoki prinosi. Među najčešće primjenjivane tehnike ekstrakcije spadaju konvencionalne metode poput maceracije, dekokcije, perkolacije, Soxlet ekstrakcije, dok se za eterična ulja najviše koriste različite metode destilacije poput destilacije vodom, parom i vodenom parom. Osim konvencionalnih metoda sve više se ispituju i različite napredne tehnike kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Navedene tehnike pred konvencionalnim imaju prednost zbog manje upotrebe organskih otapala, skraćenog vremena ekstrakcije te sve veće primjene zelenih otapala.

Stoga su ciljevi ovog rada bili: (i) prikazati pregled bioaktivnih molekula tršlje (ii) definirati sastavnice eteričnih ulja tršlje (iii) usporediti postupke ekstrakcije bioaktivnih molekula tršlje primjenom konvencionalnih i naprednih tehnika te (iv) opisati postupke izolacije eteričnih ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Morfološka i botanička obilježja tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Tršlja ili krilata smrdljika (*Pistacia lentiscus* L.) je zimzelena biljka roda *Pistacia*, porodice vonjača (Anacardiaceae). Raste kao grm ili nisko stablo do visine od 5 metara s dobro razvijenim korijenovim sustavom (Tolić, 2003).

Kora tršlje je u početku zelenkastosiva, a kasnije postaje tamnozeleno i ispucana sa sitnim ljuskama, a karakteristična je po istjecanju smolastog mirisnog soka iz ispucale kore koji se zove mastika. Listovi su ovalni i parni te perasti dužine 5 do 10 centimetara. Sastavljeni su od 3 do 5 pari jajoliko kožastih listića tamnozeleno boje. Tršlja cvate od ožujka do svibnja. Cvjetovi su jednospolni, razlikuju se muške i ženske biljke. Cvjetovi na muškim biljkama su tamnocrvene, a na ženskim žute boje u obliku klasića (Landau i sur., 2014). Imaju jednostavno ocvijeće sastavljeno od 3-5 listića. Plodovi su sitni, veličine 2-3 mm, spljoštene okrugle koštunice crvene boje i nalaze se gusto na granama. Dozrijevaju 150 do 230 dana od početka cvatnje te mijenjaju boju u iz crvene u crnu. Sjemenke se rasprostranjuju pticama (Landau i sur., 2014).



Slika 1. Izgled listova i ploda tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) (Anonymous 1)

Tršlja je sastavni dio mediteranske vegetacije i može se naći u svim zemljama Sredozemlja, od Maroka i Pirenejskog poluotoka na zapadu preko južne Francuske i Turske do Iraka i Irana na istoku (Landau i sur., 2014). U Hrvatskoj raste na otocima i priobalju (Tolić, 2003), i sastavni je dio mediteranske makije te ima različita narodna imena: mrča, crnomrta, smarča, lanjstik, entišk, lentiska, mastika (Anonymous 2). Tršlja je danas osobito popularna u Grčkoj, gdje raste poseban varijetet koji proizvodi puno smole. Tršlja raste na sunčanim i suhim stjenovitim područjima i otporna je na posolicu i žegu. Uspijeva i na lošijim skeletnim tlima uz morsku obalu. Zbog dobro razvijenog korijenova sustava ima veliku ekološku funkciju jer štiti tlo od erozije (Tolić, 2003).

2.2. Upotreba tršlje

Plodovi, smola i lišće tršlje imaju dugu tradiciju upotrebe u narodnoj medicini još iz vremena starih Grka. Zapisi o upotrebi tršlje među lokalnim stanovništvom za liječenje gastrointestinalnih problema ili za kozmetičku upotrebu mogu se pronaći čak i u tekstovima starih grčkih filozofa Galena, Teofrasta i Dioskorida (Pachi i sur, 2020). Mastika se stoljećima koristila kao osvježivač daha, jer djeluje protiv bakterija koje metaboliziraju sumporne spojeve koji najčešće i izazivaju loš zadah. Također su se od nje pripremali najstariji balzami koji su korišteni kao lijek za različita oboljenja (Tolić, 2003). Plodovi i lišće su se u narodnoj medicini koristili kao stimulans, diuretik i antihipertenziv, te za ublažavanje kašlja, upale grla, ekcema, bolova u trbuhu, bubrežnih kamenaca i žutice (Benhammou i sur., 2008). Stari Egipćani su koristili mastiku kao tamjan i za balzimiranje te kao konzervans. Filozof Avicena je spomenuo mastiku u svome djelu „Kanon medicine“ kao lijek za abnormalna krvarenja iz maternice i kao hepatoprotektiv, obično kao sastojak lijeka pripremljanog od više bilja. Arapski liječnici mastiku su smatrali deterdžentom i adstringentnim sredstvom. U jordanskoj narodnoj medicini vodeni ekstrakt koristio se za liječenje žutice. U sjevernoafričkoj tradicionalnoj medicini mastikovo ulje se kao lijek za vanjsku upotrebu koristilo za liječenje grlobolje, opekotina i rana, a oralno za respiratorne poremećaje. U tuniskoj narodnoj medicini ulje se koristilo i kao antiseptik i za liječenje raka (Akbar, 2020). Mastika vrlo učinkovito uništava bakteriju *Helicobacter pylori* koja je odgovorna za nastanak peptičkog ulkusa i gastritisa.

Listovi i plodovi su se tradicionalno koristili u liječenju arterijske hipertenzije zahvaljujući svojim diuretičkim svojstvima. Listovi imaju protuupalno, antibakterijsko, antifungalno, antipiretsko, adstringentno, hepatoprotektivno i ekspektorantno djelovanje te djeluju kao

stimulans. Koriste se u liječenju ekcema, oralnih infekcija, proljeva, bubrežnih kamenaca, žutice, glavobolje, astme i respiratornih problema. U Tunisu su se plodovi tršlje koristili u liječenju svraba, reumatizma, manjih opekotina i u proizvodnji lijekova protiv dijareje (Trabelsi i sur., 2016).

Eterično ulje dobiveno od smole tršlje naziva se mastikovo ulje, dok se ulje dobiveno iz lišća naziva lentiskovo ulje. Plodovi tršlje sadrže puno ulja i tiještenjem prokuhanih plodova se dobiva jestivo ulje. Destilacijom vodenom parom listova dobiva se eterično ulje koje se može koristiti u tretiranju proširenih vena, bolnih i umornih nogu, zastoja limfe (otečene noge) i hemoroida, a zna se koristiti i kod prostatitisa, jer smanjuje tegobe nastale upalnim povećanjem prostate (Boudieb i sur., 2019). Listovi su bogati taninima i u prošlosti su se koristili za bojanje tkanina i kao prehrambena bojila (Longo i sur., 2007).

Vodeni ekstrakti lišća i mladih grančica pripremaju se kao infuzije i dekokti. Ljudi su ih upotrebljavali za prevenciju probavnih problema, bronhitisa, pranje zubi, protiv žutice, mokrenja u krevet i glavobolje uzrokovane prehladom. Lišće i mlade grančice također se koriste u veterini za liječenje ektoparazita, zacjeljivanje rana (vanjska primjena ulja dobivenog od plodova i lišća) te nadimanja i bolova u trbuhu (oralan unos lišća) (Landau i sur., 2014).

U posljednje vrijeme se ulje lišća i grančica koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, te parfumeriji i aromaterapiji u obliku krema, losiona, šampona i ulja, a danas se koristi i kao aroma u alkoholnim pićima i žvakaćim gumama (Lo Presti i sur., 2008).

U prošlosti se tršlja koristila kao prehrambeni sastojak mnogih jela. Kao začim, u Grčkoj se i danas koristi za aromatiziranje alkoholnih pića i likera (tradicionalni napitak otoka Chios-a Mastichato), žvakaćih guma i brojnih kolača, peciva, slastica i deserata. Ponekad se koristi i u izradi sira. Mastika je ključni sastojak grčkih festivalskih kruhova, na primjer slatkog kruha *tsoureki* i tradicionalne novogodišnje torte *vasilopita*. Također se koristi za izradu *dondurma* (turskog sladoleda) i turskog pudinga. U Libanonu i Egiptu se koristi kao začim za aromatiziranje mnogih jela, od juha i mesnih jela do deserata.

Ekstrakt tršlje koristi se kao dodatak tradicionalno proizvedenim ciparskim kobasicama za sprečavanje oksidacije lipida i produljenje trajnosti tradicionalnih kobasica od svježeg svinjskog mesa (Botsaris i sur., 2015).

U 2015. godini Europska agencija za lijekove (EMA) prepoznala je mastiku kao biljni lijek s dvije terapijske indikacije – za blage dispeptičke poremećaje i upalu kože/zacjeljivanje manjih rana (Pachi i sur., 2020).

2.3. Fenolni spojevi tršlje

Pored tradicionalnih primarnih metabolita: lipida, ugljikohidrata, aminokiselina i proteina, biljke često akumuliraju raznoliku skupinu sekundarnih metabolita – fenolne spojeve. Fenolni spojevi imaju ulogu u formiranju arome, okusa i boje (što je važno zbog privlačenje insekata i ptica za oprašivanje i raznošenje sjemenki), služe kao obrambeni mehanizam biljke, sudjeluju u regulaciji fizioloških procesa (rast, zrenje i dozrijevanje) te štite od UV zračenja. Uglavnom se akumuliraju na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi) jer biosinteza ovisi o svjetlu. Fenolni spojevi su biološki aktivne molekule čiju osnovnu strukturu čini jedan ili više benzenskih prstena na koje mogu biti vezane hidroksilne skupine ili drugi supstituenti (Trablesi i sur., 2016). Postoji više načina klasifikacije fenolnih spojeva, najčešće se klasificiraju u skupine prema broju prstena koje sadrže i vrstama supstituenta. Također se mogu klasificirati s obzirom na biosintetski put kojim nastaju ili biološku aktivnost (Ozcan i sur., 2014). Fenolni spojevi obuhvaćaju oko 8000 različitih molekulskih vrsta i s obzirom na strukturu dijele se na: flavonoide i ne-flavonoide. Flavonoidi su flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, izoflavoni, i antocijani, dok u ne-flavonoide spadaju fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline), tanini (hidrolizirani i kondenzirani), stilbeni, kumarini i lignani (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020), a u tršlji se uglavnom koncentriraju u lišću i grančicama (Landau i sur., 2014).

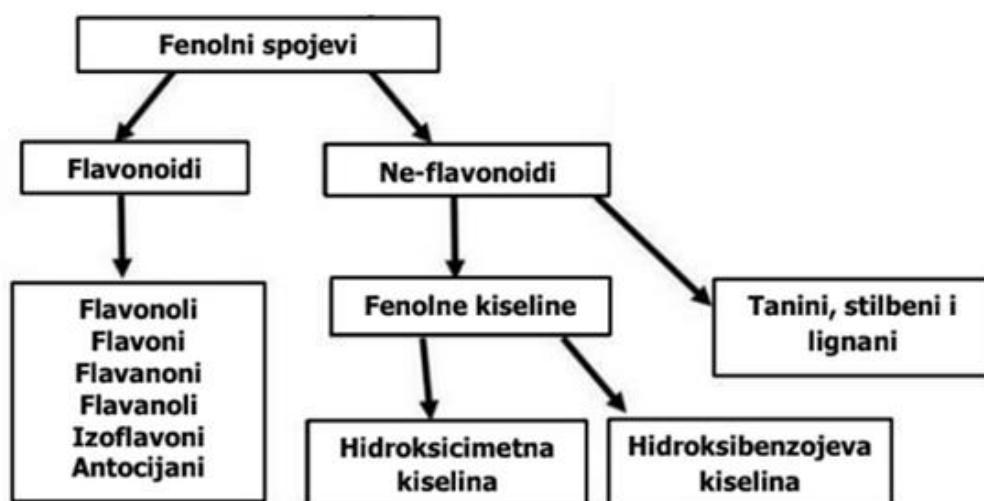
Ekstrakti tršlje su dobar izvor bioaktivnih spojeva koji pokazuju snažno antioksidacijsko djelovanje, štite stanicu od oksidacije i smanjuju rizik od pojave različitih degenerativnih bolesti (karcinoma, dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti) koje su povezane s oksidativnim stresom. Tršlja ima neuroprotektivni učinak zbog visokog udjela flavonola i galne kiseline (Azib i sur., 2019). Dosadašnja istraživanja su pokazala da na kemijski sastav biljke jako utječu vanjski uvjeti poput klime, sastava tla i geografskog smještaja (Trabelsi i sur., 2016). Biološka aktivnost ovisi o broju, poziciji i vrsti supstituenata (Kurtagić, 2017).

Tri glavne klase sekundarnih metabolita tršlje su: (1) galna kiselina i derivati galola glukoze i kvininske kiseline; (2) flavonolni glikozidi, tj. miricetin i kvercetin i (3) antocijani: delfinidin 3-O-glukozid i cijanidin 3-O-glukozid. Sadrži i male količine katehina. Koncentracija galolnih

derivata predstavlja 5,3% suhe mase lišća, a također sadrži i značajne količine derivata miricetina (Romani i sur., 2002).

Analiza lišća, stabljika, plodova i korijena *P. lentiscus* pokazala je prisutnost glavnih skupina sekundarnih metabolita - flavonoida, tanina i antocijana. Ukupna koncentracija fenolnih spojeva u lišću (216.289 ± 20.62 mg galne kiseline/g suhe tvari) bila je značajno veća od onih otkrivenih u stabljikama (121.399 ± 3.354 mg galne kiseline/g suhe tvari) i plodu (103.342 ± 2.317 mg galne kiseline/g suhe tvari). Korijen je imao razmjerno nižu ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva, 30.188 ± 1.291 mg galne kiseline/g suhe tvari. Listovi također sadrže najveće koncentracije flavonoida (121.515 ± 9.171 mg katehina/g suhe tvari) i kondenziranih tanina (19.162 ± 0.436 mg katehina/g suhe tvari), a plodovi nešto niže koncentracije flavonoida (4.696 ± 0.329 mg katehina/g suhe tvari) i kondenziranih tanina (7.893 ± 0.481 mg katehina/g suhe tvari). Ekstrakti lišća, stabljike i korijena imaju snažan ukupni antioksidacijski kapacitet te mogućnost uklanjanja slobodnih radikala, za smanjenje snage i inhibiciju oksidacije β -karotena. Plodovi imaju najslabije antioksidacijsko djelovanje (Zitouni i sur., 2016; Botsaris i sur., 2015).

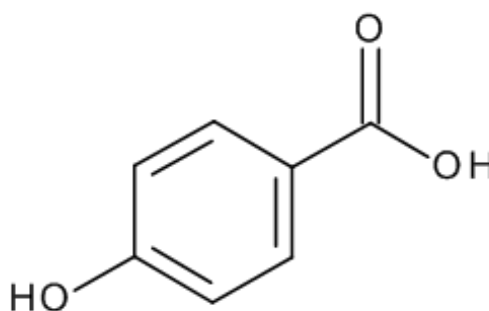
U lišću su najzastupljeniji fenolni spojevi galna kiselina, katehin, siringinska kiselina, elaginska kiselina, kvercetin-3-O-ramnozid i luteolin, a u plodovima su najzastupljenije galna kiselina, katehin, 3,4-dihidroksicimetna kiselina, benzojeva kiselina, salicilna kiselina i luteolin (Mehenni i sur., 2016).



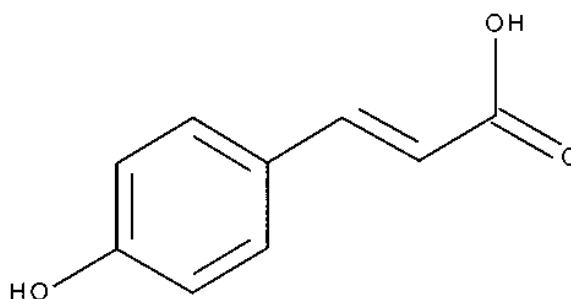
Slika 2. Klasifikacija fenolnih spojeva (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020)

2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se po strukturi mogu podijeliti u dvije grupe: hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline su galna, 4-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska, elaginska i siringinska kiselina, koje imaju zajedničku strukturu C6-C1. U prirodi su uglavnom prisutne u slobodnom obliku ili konjugirane u šećerima i organskim kiselinama. Hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi sa strukturom C6-C3, a najčešće su p-kumarinska, kava, ferulinska i sinapinska kiselina (Ozcan i sur., 2014).



Slika 3. Strukturni prikaz hidroksibenzojeve kiseline (Anonymous 3)



Slika 4. Strukturni prikaz hidroksicimetne kiseline (Anonymous 4)

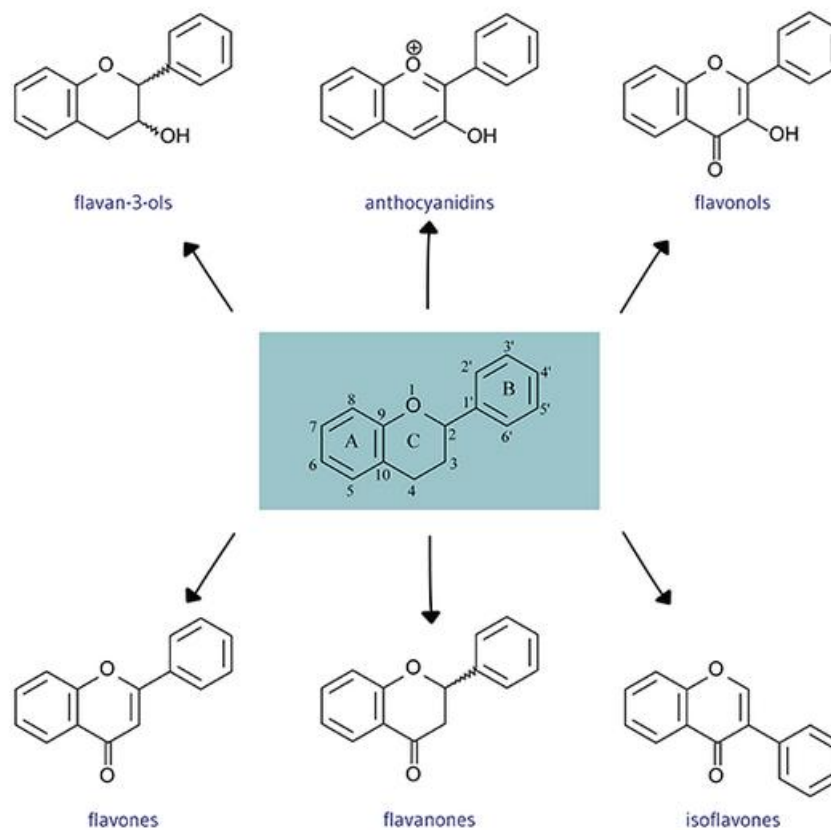
Galna kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u lišću tršlje te koncentracija iznosi 161.67 ± 35.27 mg galne kiseline/g. Nakon galne kiseline druga po zastupljenosti u lišću tršlje je siringinska kiselina, čija koncentracija iznosi $52,66 \pm 7,23$ mg/g. Elaginska kiselina je najmanje zastupljena u lišću tršlje, 9.54 ± 0.63 mg/g (Mehenni i sur., 2016).

Za razliku od lišća, plodovi su slabi izvor fenolnih kiselina. Koncentracija galne kiseline u plodovima tršlje iznosi samo 5.67 ± 0.017 mg/g (Mehenni i sur., 2016). Digalna kiselina iz plodova tršlje ima antimutagena svojstva (Bozorgi i sur., 2013).

Listovi tršlje bogat su izvor derivata galne kiseline poput mono, di i tri-O-galol-kvininske kiseline i monogaloil glukoze, dok su u plodovima tršlje identificirane 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza i 3,4,5-O-trigaloilkina kiselina (Bozorgi i sur. 2013; Benhammou i sur., 2008). Derivati hidroksicimetne kiseline prisutni u plodovima tršlje su *p*-kumarinska-4-*O*-glukozid, kvininska kiselina i kava kiselina (Bozorgi i sur. 2013).

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi male molekulske mase čija se temeljna struktura sastoji od C6-C3-C6 kostura. Sastoje se od dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C). Uglavnom su podijeljeni u dvije klase: antocijane i antoksanine (skupina bezbojnih spojeva koja su podijeljeni u flavone, flavane, flavonole, izoflavone i njihove glikozide) (Ozcan i sur., 2014). U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s različitim molekulama šećera (Kurtagić, 2017).



Slika 5. Podjela flavonoida (Anonymous 5)

Flavonoidi su pigmenti odgovorni za većinu obojenja u cvjetovima i plodovima tršlje ali i ostalih biljaka. Imaju mnogo terapijskih svojstva i utječu na održavanje dobre cirkulacije. Mogu imati i protuupalna i antivirusna svojstva ali i zaštitne učinke na jetru (Trabelsi i sur., 2016).

Ekstrakti tršlje sadrže značajne količine flavonola (u plodu od $8,0 \pm 0,1$ do $33,1 \pm 1,1$ i u lišću od $20,1 \pm 1,1$ do $34,6 \pm 1,3$ mg rutina/g ekstrakta) i hidroksicinamata (u plodu od $5,4 \pm 0,2$ do $22,2 \pm 0,8$ i u lišću od $8,4 \pm 0,3$ do $16,5 \pm 0,7$ mg kafeinske kiseline/g ekstrakta) (Botsaris i sur., 2015). Udio flavonoida u tršlji je od 13.78 mg rutina/g do 23.46 mg rutina/g (Trabelsi i sur., 2016).

Flavonoli čine značajnu skupinu flavonoida tršlje, a najzastupljeniji su kvercetin, taksifolin, kvercetin-3-O-glukuronid i luteolin 6,8-di-C-heksozid (Trabelsi i sur., 2016). U plodovima tršlje prevladava derivat kvercetina, kvercetin-3-O-glukuronid (Trabelsi i sur., 2016). U lišću tršlje identificiran je kvercetin-3-O-ramnozid u koncentraciji od $0,12 \pm 0,053$ mg/g suhog ekstrakta lista (Mehenni i sur., 2016). Kvercetin-3-glukozid također je izoliran iz lišća tršlje (Bozorgi i sur., 2013). Derivati miricetina predstavljaju 20% ukupne koncentracije fenolnih spojeva lišća tršlje (Bozorgi i sur., 2013). Derivati miricetina u lišću tršlje su miricetin 3-O-ramnozid i miricetin 3-O-rutinozid (Romani i sur., 2002).

Flavoni su široko rasprostranjeni među biljkama u obliku aglikona ili glikozida (Murkovic, 2003). Najznačajniji predstavnici flavona su luteolin i apigenin (Pathak i sur., 2018). Luteolin se u plodovima tršlje nalazi u koncentraciji od 2.97 ± 0.1 mg/g suhog ekstrakta ploda, a njegova koncentracija u lišću je nešto manja, iznosi 0.61 ± 0.01 mg/g suhog ekstrakta (Mehenni i sur., 2016).

Flavanoli ili flavan-3-oli su skupina flavonoida od kojih su najzastupljeniji u biljkama katehini i proantocijanidini (Pathak i sur., 2018). Katehini su monomerni flavonoli, a ostali monomerni flavonoidi su epikatehin, epigalokatehin, galokatehin i njihovi derivati galata. Proantocijanidi su polimerizirani flavanoli (Watson i sur., 2017). Od flavanola, u tršlji se jedino nalazi katehin u manjim količinama. Katehin se u lišću tršlje nalazi u koncentraciji od 31.79 ± 5.76 mg/g suhog ekstrakta, a njegova koncentracija u plodovima je znatno manja, iznosi 0.2 ± 0.001 mg/g suhog ekstrakta (Mehenni i sur., 2016).

Antocijanini su biljni pigmenti u glikoziliranom obliku. Odgovorni su za crvenu, ljubičastu i plavu boju voća i povrća. Cijanidin-3-glukozid je glavni antocijanin koji se nalazi u većini

biljaka. Najčešći tipovi antocijanidina su cijanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin (Khoo i sur., 2017). Antocijani cijanidin-3-O-glukozid i delfinidin-3-O-glukozid otkriveni su u bobicama i lišću tršlje (Bozorgi i sur., 2013). U lišću tršlje cijanidin-3-O-glukozid nalazi u koncentraciji od 0.4 ± 0.12 mg/g suhog ekstrakta, a koncentracija delfinidin-3-O-glukozida iznosi 0.8 ± 0.22 mg/g suhog ekstrakta (Romani i sur., 2002). U tršlji je također identificiran cijanidin-3-O-arabinozid u manjim koncentracijama (Longo i sur., 2007).

2.3.3. Ostali fenolni spojevi

Osim fenolnih kiselina i flavonoida, ostali fenolni spojevi tršlje su tanini i sekoiridoidi (Trablesi i sur., 2016).

Tanini se dijele u dvije skupine: hidrolizirani i kondenzirani tanini. Hidrolizirani tanini se dijele na galotanine, elagitanine i složene tanine (derivate šećere - uglavnom glukoze, galne kiseline i derivate elaginske kiseline). Kondenzirani tanini se još nazivaju i procijanidini (Swanson, 2003). Tanini tršlje su hidrolizirani (galotanini) i kondenzirani tanini (Boudieb i sur., 2019). 75% fenolnih spojeva tršlje su hidrolizirani tanini koji su većinom topljivi u vodi (Mehenni i sur., 2016). Koncentracije tanina u plodovima i lišću tršlje razlikuju se ovisno o klimi i tlu gdje biljka raste. Azaizeh i sur. (2013) navode da je koncentracija kondenziranih tanina (flavonol glukozida) u tršlji od 22,8% (od ukupnih fenolnih spojeva) u biljci koja je rasla u Italiji do 28,6% u biljci iz Izraela. Također navode da koncentracija hidroliziranih tanina (galoil derivata) varira od 63,6% u biljci porijeklom iz Izraela do 74,7% u biljci porijeklom iz Italije.

Tanini se u lišću tršlje nalaze u koncentraciji od 409.87 ± 6.9 mg taninske kiseline/g suhog ekstrakta, od toga su kondenzirani tanini 19.162 ± 0.436 mg CE/g (Mehenni i sur., 2016; Zitouni i sur., 2016). U plodovima koncentracija tanina iznosi 309.45 ± 6.88 mg taninske kiseline/g suhog ekstrakta (Mehenni i sur., 2016). Mladi listovi tršlje su bogatiji izvor tanina u usporedbi sa zrelim lišćem (Dogan i sur., 2003).

Identificirani sekoiridoid u plodovima tršlje je oleozid, a osim u tršlji prisutan je u maslinama i maslinovom ulju. Važnost ovog spoja je u tome što sprječava ili usporava rast različitih bakterija i gljivica (Trabelsi i sur., 2016).

2.4. Eterična ulja tršlje

Eterična ulja sastavljena su od lipofilnih tvari i sadrže lako hlapive spojeve koji čine aromu biljnog materijala. Eterično ulje predstavlja mali udio biljnog sastava, a sastoji se uglavnom od terpena odnosno monoterpena (C₁₀) koji mogu činiti više od 80% eteričnog ulja i seskviterpena (C₁₅), te njihovih kisikovih derivata poput alkohola, aldehida, ketona, kiselina, fenola, etera, estera, itd. (Fornari i sur., 2012).

Eterična ulja se mogu dobiti iz korijena, lišća, grana, cvjetova, plodova i sjemenki biljke. Iako svi dijelovi biljke sadrže eterična ulja, njihov sastav može znatno varirati ovisno o dijelu biljke koji se koristi kao sirovina. Ostali čimbenici kao što su obrada, tlo i klimatski uvjeti, vrijeme branja također mogu odrediti sastav i kvalitetu eteričnog ulja (Fornari i sur., 2012).

Smola se dobiva zarezivanjem biljke, poput grančica i listova, te također može služiti za destilaciju eteričnog ulja. Smola nastaje reakcijom spoja β -mircena koji se polimerizira, pri čemu nastaje polimircen, no u sastavu smole se ističu i spojevi poput pinena.

Eterična ulja tršlje se sastoje od monoterpena, monoterpenskih estera i monoterpenskih alkohola (45–68,3%) te seskviterpena (9,2–28,1%) (Landau i sur., 2014; Chryssavgi i sur., 2008). Koncentracija monoterpena je najveća u fazi cvatnje i iznosi 81,6% (Chryssavgi i sur., 2008).

Eterična ulja tršlje sadrže 19-25% mircena, 16% α -pinena, 22%- 44% terpinen-4-ola i 65% δ -3-karena, 13% α -terpineola te u manjim koncentracijama limonen, sabinen, p-cimen i γ -terpinen (Benhammou i sur., 2008; Lo Presti i sur., 2008).

α -pinen u oleorezinu (smoli), β -mircen i sabinen u plodu, te limonen, mircen, sabinen i terpinen-4-ol u lišću tršlje su glavni spojevi u eteričnom ulju tršlje (Bozorgi i sur., 2013). U ulju lišća su najviše zastupljeni monoterpenski ugljikovodici, α -pinen (37,9–51,5%) i mircen (27,0–69,7%) (Mecherara-Idjeri i sur., 2008). Seskviterpeni su znatno slabije zastupljeni u eteričnom ulju tršlje od monoterpena. Germacren-D i β -kariofilen u eteričnom ulju lišća tršlje su najzastupljeniji seskviterpeni (Bozorgi i sur., 2013).

Smola biljaka roda *Pistacia* sadrži i triterpene, penta i tetracikličke triterpene. Triterpeni tršlje su mastikadienska kiselina, mastikadienolična kiselina, oleanolinska kiselina, ursolična kiselina te njihovi derivati (Bozorgi i sur., 2013).

Ulje sjemena tršlje ima visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina (približno 80%) s najviše oleinske (>50%) i linolne (>20%) kiseline te s više od 8 mg/g tokoferola, koji daje antioksidacijsko djelovanje (Landau i sur., 2014). Ulje tršlje sadrži 119 mg α -tokoferola/kg ulja, a γ -tokoferola 23 mg/kg (Mezni i sur., 2020).

Ukupni udio triacilglicerola tijekom zrenja plodova se brzo povećava sa 105 na 966 mg/100 g ulja između 35. i 175. dana nakon stvaranja plodova. Dioleopalmitin (POO) je glavni triacilglicerol u drugom stupnju sazrijevanja. U ulju *P. lentiscus* identificirane su četiri klase fosfolipida: fosfatidinska kiselina (PA), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilglicerol (PG) i fosfatidilinozitol (PI). Ukupni sadržaj fosfolipida tijekom zrenja plodova se smanjuje sa 45,5% u 15. danu zrenja na 6,88% u 175. danu zrenja (Trablesi i sur., 2014).

2.5. Biološka svojstva ekstrakata i eteričnih ulja tršlje (fenoli i eterična ulja)

Ekstrakti i eterična ulja tršlje imaju antibakterijsko, antifungalno, antioksidativno i antihepatičko djelovanje te utječu na apoptozu i angiogenezu.

Ekstrakti listova tršlje imaju antioksidativno djelovanje, što se može pripisati djelovanju bioaktivnih spojeva poput fenolnih kiselina i flavonoida (Chryssavgi i sur., 2008). Ekstrakti lišća imaju sposobnost uklanjanja DPPH (1,1-difenil-2 pikril-hidrazil) radikala i anionskih superoksidnih radikala (Benhammou i sur., 2008). Derivati kvininske i galne kiseline, poput 5-O-galola, 3,5-O-digalola, 3,4,5-O-trigaloilkina kiseline imaju sposobnost uklanjanja DPPH, superoksidnih (O_2^-) i hidroksilnih (OH^\cdot) radikala. Također smanjuju oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) (Benhammou i sur., 2008; Baratto i sur., 2003).

Konzumacija mastike smanjuje koncentracije ukupnog serumskog kolesterola, LDL kolesterola, omjera ukupnog kolesterola i HDL kolesterola, lipoproteina, apolipoproteina A1 (uklanjaju prekomjerni kolesterol iz tkiva), apolipoproteina B, ALT (alanin-aminotransferaza, se izlučuje u krvotok kada su oštećene stanice srca ili jetre), AST (aspartat-aminotransferaza, se izlučuje u krvotok kada su oštećene stanice srca ili jetre) što ukazuje na hepato-zaštitno djelovanje mastike (Landau i sur., 2014).

Prisutnost galne kiseline i njenog derivata, 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza u plodovima, ima zaštitnu ulogu protiv peroksidacije lipida izazvane vodikovim peroksidom (H_2O_2) (Benhammou i sur., 2008).

Tršlja ima potencijalno antikancerogeno djelovanje. Mastikovo ulje uzrokuje inhibiciju proliferacije stanica raka (Landau i sur., 2014). Mastika s grčkog otoka *Chiosa* sadrži spojeve koji inhibiraju proliferaciju i induciraju smrt HCT116 stanica raka debelog crijeva kod ljudi (Benhammou i sur., 2008). Digalna kiselina iz ploda tršlje ima proapoptotički učinak na stanice leukemije kod ljudi (Landau i sur., 2014).

Ekstrakti flavona tršlje pokazuju antifungalno djelovanje protiv kvasca i plijesni, ali ne i antibakterijsko. Ekstrakti imaju sposobnost inhibicije rasta plijesni roda *Fusarium* između 8,25 i 28,81% (Benhammou i sur., 2008).

Ulje mastike pokazuje antibakterijska, protuupalna i antioksidacijska svojstva (Serifi i sur., 2019). Ulje tršlje se koristi u tradicionalnoj medicini za zacjeljivanje rana i liječenje želučanih tegoba i astme. Ima antioksidativna i antibakterijska svojstva, te zaštitni učinak u slučaju trovanja teškim metalima (Mezni i sur., 2020).

α -tokoferol, koji se uglavnom dobiva iz ulja sjemenki tršlje, ima značajnu vitaminsku aktivnost, inhibira aktivnost protein kinaze C, enzima koji sudjeluje u proliferaciji stanica i diferencijaciji stanica glatkih mišića, trombocita i monocita. Također ima jaka antioksidacijska i protuupalna svojstva (Mezni i sur., 2020). Monoterpeni u ulju tršlje imaju jako antioksidacijsko djelovanje (Chryssavgi i sur., 2008).

Eterično ulje smole tršlje ima antimikrobno i antifungalno djelovanje, dok ulja dobivena iz lišća i grančica imaju umjereno djelovanje protiv bakterija i potpuno su neaktivna protiv gljivica. Ulje plodova tršlje se može primjenjivati i kao antidijaroici (Benhammou i sur., 2008).

Ulje mastike pokazuje antibakterijsku aktivnost protiv bakterija *S. aureus* i *B. subtilis*, te srednju aktivnost protiv *E. coli*. Sve su bakterije otporne na djelovanje α -pinena. Iako verbenon, α -terpineol i linalool predstavljaju samo 0,07, 0,01 i 0,5% mastikova ulja, oni imaju snažno antibakterijsko djelovanje i jako doprinose antibakterijskom djelovanju ulja. Mastika i ekstrakti mastike imaju antibakterijsko djelovanje protiv bakterije *Helicobacter pylori* koja uzrokuje gastritis. Istraživanja na štakorima su pokazala da konzumacija mastike pomaže i kod smanjivanja simptoma gastritisa te da smanjuje oštećenje na želučanoj sluznici uzrokovano gastritisom (Landau i sur., 2014). Konzumacija mastike kao žvakaće gume smanjuje koncentraciju bakterije *S. mutans* u ustima (Landau i sur., 2014).

2.6. Postupci ekstrakcije fenolnih spojeva tršlje

Ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcija je proces prijenosa jedne ili više tvari iz materijala u kojem se nalaze u tekuću fazu nakon čega slijedi proces separacije i izdvajanja tvari iz tekuće faze. Temelji na koncentracijskom gradijentu; koncentracija komponenti u otapalu manja je od njihove koncentracije u biološkom materijalu i komponente procesom difuzije prelaze iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012). Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o: viskoznosti otapala, površini materijala izloženog ekstrakciji, topljivosti komponenti u otapalu te temperaturi (Režek Jambrak, 2017).

Na djelotvornost ekstrakcije fenolnih spojeva utječu veličina čestica, vrste i polarnost otapala, odnos otapala i uzorka, vrijeme i temperatura te metoda ekstrakcije (Hernández i sur., 2009; Mariya John i sur., 2006). Ekstrakcija se može odvijati kao kontinuirana i diskontinuirana, jednostepena, višestepena, višestepena protustrujna te kao ekstrakcija unakrsnim stupanjem s jednim otapalom.

2.6.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

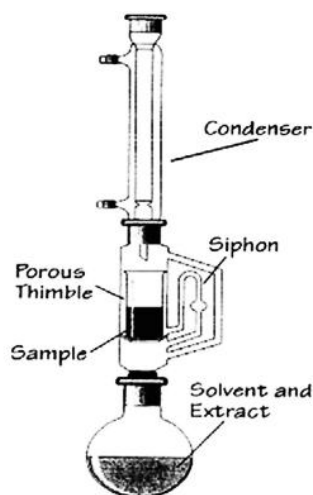
U konvencionalnim metodama ekstrakcije obično se koriste organska otapala i potrebna je velika količina otapala te dugo vrijeme ekstrakcije (Zhang i sur., 2018). Konvencionalne metode dobivanja biljnih ekstrakata provode se postupcima maceracije, dekokcije, perkolacije uz primjenu vode, vodenih otopina alkohola ili organskih otapala. Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze može se izvoditi pri sobnoj temperaturi (maceracija, perkolacija) i pri povišenoj temperaturi (infuzija, dekokcija).

Maceracija je jednostavna metoda ekstrakcije. Sirovina se natapa u odabranom otapalu na sobnoj temperaturi najmanje 3 dana, uz često miješanje. Nakon ekstrakcije, otapalo se ukloni iz smjese, često vakuumskim isparavanjem, zbog koncentriranja produkta. Najvažniji je izbor otapala, a ono može biti polarno ili nepolarno. Nedostatak ove metode je dugo vrijeme ekstrakcije i mala učinkovitosti ekstrakcije (Mazzutti i sur., 2020). Maceracija se može izvoditi na sobnoj temperaturi ili na hladnom. Hladna maceracija odvija se na temperaturama nižim od 15 °C pri čemu dolazi do ekstrakcije aromatskih spojeva (npr. monoterpena), a izbjegava se veća ekstrakcija polifenolnih spojeva sklonih oksidaciji (Jagatić Korenika i sur., 2017). Ova metoda je pogodna za ekstrakciju termolabilnih komponenti (Zhang i sur., 2018).

Dekokcija je metoda ekstrakcije biljke kuhanjem u ključaloj vodi. Vrijeme kuhanja je između 5 i 15 minuta. Ova metoda se koristi za tvrde dijelove biljke poput korijena i kore za koje je potrebno duže vrijeme da vruća voda prodre u unutrašnjost biljnih dijelova i ekstrahira aktivne tvari (Nagalingam, 2017). Dekokcija se ne može koristiti za ekstrakciju termolabilnih komponenti ili onih koje lako isparavaju poput eteričnih ulja (Zhang i sur., 2018).

Perkolacija je kontinuirana ekstrakcija usitnjenog biljnog materijala na sobnoj temperaturi (Anonymous 6). Kod perkolacije biljka se stavi iznad posude s otapalom, a iznad biljnog materijala postavi se hladilo. Otapalo se zagrijava na temperaturu vrenja otapala, te ono isparava, hladi se u hladilu i kapa po biljnom materijalu vršeći na taj način ekstrakciju. Otapalo s ekstrahiranim spojevima iz biljke pada nazad u zagrišanu posudu s otapalom. Budući da se otapalo konstantno zagrijava na temperaturu vrenja, neprestano se ponavlja ciklus u kojem se otapalo kondenzira i kapa na biljni materijal te se otopljene tvari skupljaju u posudu ispod biljnog materijala (Anonymous 7). Perkolacija se može provoditi uz primjenu vode, organskih otapala (poput etanola) ili vodenih otopina alkohola. Perkolacija je učinkovitija od maceracije jer je to kontinuirani proces u kojem se zasićeno otapalo neprestano zamjenjuje svježim otapalom (Zhang i sur., 2018).

Ekstrakcija po Soxhletu je metoda ekstrakcije spojeva iz čvrstih materijala kojom se određuje sadržaj masti. Glavna prednost ove metode je kontinuirano ekstrahiranje biljke svježim otapalom (Zhang i sur., 2018). Svježe otapalo se kondenzira i ekstrahira biljni materijal kontinuirano. Nedostatci ove metode su što se ekstrakt kontinuirano zagrijava na temperaturu vrenja otapala, što može dovesti do termičkog razlaganja spojeva u uzorku i dugo vrijeme ekstrakcije (Handa i sur., 2008).



Slika 6. Soxhlet metoda (Gunturu, 2018)

Otapala koja su najčešće korištena u konvencionalnim metodama izolacije fenolnih spojeva iz tršlje su etanol (Benhammou i sur., 2008), metanol (Trabelsi i sur., 2016) i otopina metanol : voda = 70 : 30 (Chryssavgi i sur., 2008). Većina klasičnih metoda koristi organska otapala u velikim količinama i okarakterizirane su niskom selektivnošću i potrebom za visokim temperaturama, što može dovesti do degradacije termolabilnih spojeva. Upravo iz tih razloga sve značajnije mjesto u industriji zauzimaju suvremene metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija pomoću ultrazvuka i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Rajić i sur., 2015).

2.6.2. Napredne tehnike ekstrakcije

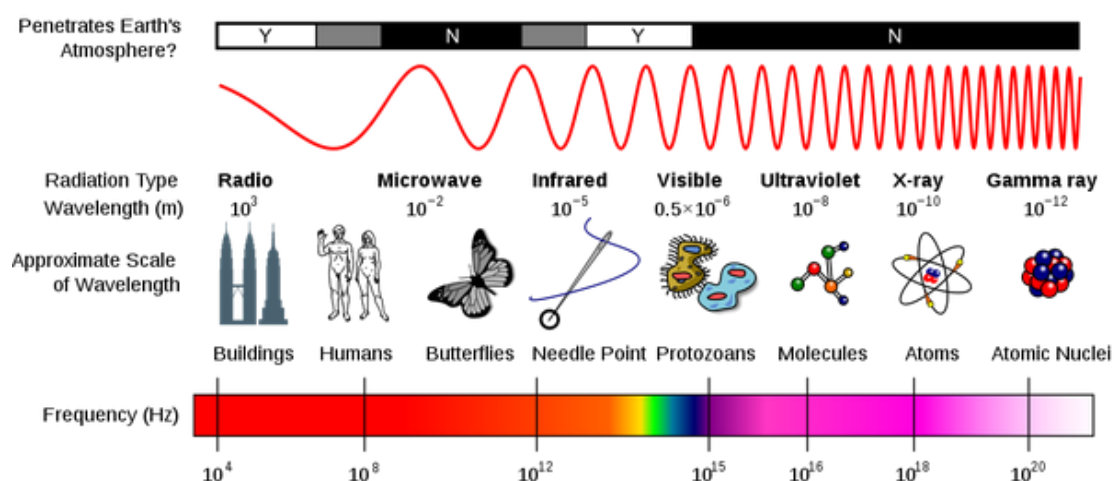
Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*engl. Microwave-assisted extraction, MAE*) je jednostavna i ekonomična ekološki prihvatljiva tehnika za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz različitih biljnih materijala (Kothari i sur., 2012), koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s čvrstom uzorkom kako bi se izazvalo izdvajanje komponenti uzorka u otapalo (Veggi i sur., 2013).

Mikrovalovi stvaraju električna i magnetska polja koja su okomita jedna na druga. Električno polje izaziva zagrijavanje pomoću dva mehanizma, dipolne rotacije i ionske provodljivosti. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka istovremeno i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola (Kothari i sur., 2012). Toplina dobivena mikrovalovima izravno se prenosi na otapalo i vodu unutar uzorka te to dovodi do intenzivnog gibanja molekula i rotacije dipola odnosno zagrijavanja uzorka. Zagrijana vlaga iz uzorka isparava, stvarajući visoki tlak pare koji stvara pritisak na staničnu stijenku i dolazi do njenog pucanja. Pucanjem stanične stijenke omogućuje se prodor otapala unutar stanice i oslobađa se eterično ulje (Handa i sur., 2008).

Otapala korištena za MAE imaju visoku dielektričnu konstantu i sposobnost da apsorbiraju mikrovalnu energiju (Kothari i sur., 2012). Izbor otapala ovisi o: topljivosti ekstrakata, selektivnosti otapala prema ekstrahiranom spoju, sposobnosti otapala da stupi u interakciju s matriksom čvrste tvari, dielektričnoj konstanti i mogućnosti upijanja energije mikrovalova. Što je veća dielektrična konstanta otapala, to je brže zagrijavanje uzorka (Kothari i sur., 2012).

Otapala poput acetona koja ne apsorbiraju mikrovalove pokazala su se najboljima za ekstrakciju fenolnih spojeva, a otapala poput heksana za ekstrakciju termolabilnih komponenti (Kothari i sur., 2012).

Postoje dvije vrste ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Kothari i sur., 2012; Kaufmann i Christen, 2002).



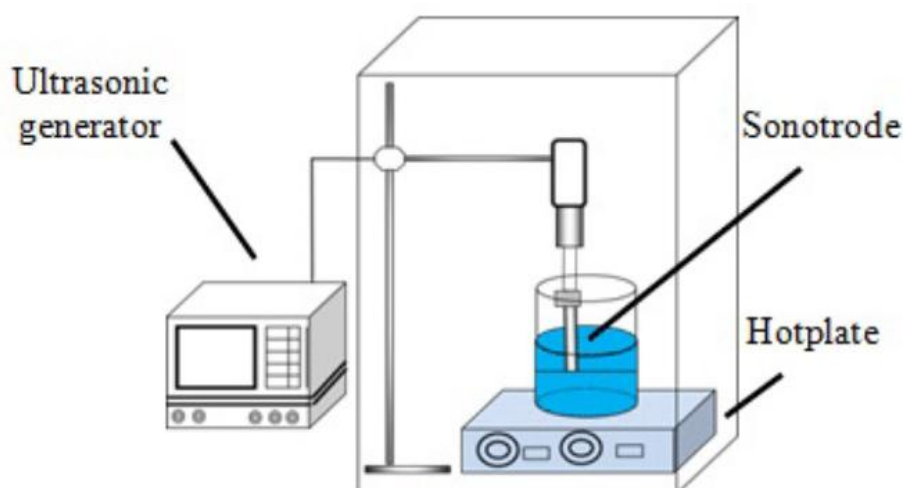
Slika 7. Frekvencija mikrovalova (Anonymous 8)

Prednost ove tehnike je što ima kraće vrijeme ekstrakcije, manje otapala je potrebno za ekstrakciju, veću čistoću ekstrakta, niske troškove i bolji prinos ekstrakcije u usporedbi sa Soxhlet metodom (Kothari i sur., 2012; Zhang i sur., 2018).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*engl. Ultrasound assisted extraction, UAE*) uključuje primjenu visoko intenzivnih, visokofrekventnih zvučnih valova i njihovu interakciju s uzorkom (Kothari i sur., 2012). Spada u jednu od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenskom periodu, jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Tijekom tretiranja uzorka ultrazvukom, dolazi do fenomena kavitacije koji uzrokuje brzo razaranje stanične stijenke, oslobađanje staničnog materijala i olakšan je pristup otapala staničnom sadržaju što rezultira skraćenim vremenom ekstrakcije i povećanom efikasnošću ekstrakcije te poboljšavanjem prijenosa mase (Kothari i sur., 2012). Ultrazvučni valovi mogu se podijeliti na visokofrekventni ultrazvuk, te ultrazvuk visokog intenziteta. Ultrazvuk visoke snage, djeluje na nižim frekvencijama, obično od 20 do 100 kHz, s intenzitetom zvuka u rasponu od 10 do

1000 W/cm² gdje uslijed djelovanja kavitacije na stanične stijenke, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice i povećane efikasnosti ekstrakcije. Uz otapalo, temperaturu i tlak, za optimiziranje procesa potrebno je optimizirati i ostale faktore poput frekvencije, vremena tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova. Metodom ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih tvari nastoji se smanjiti upotreba otapala ili potpuno izbjegnuti njihova upotreba, a sve više se primjenjuju GRAS otapala („generally recognised as safe“) (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Visoka razina energije koja je dostupna u ultrazvuku visoke snage čini ga prikladnim za upotrebu u prehrambenoj industriji za poboljšanje procesa poput ekstrakcije ulja, ekstrakcije bioaktivnih spojeva, površinske dekontaminacije, inaktivacije mikroba, inaktivacije enzima te odvajanje škroba i proteina (Bimakr i sur., 2017).

Ova metoda ne zahtijeva složene instrumente i relativno je jeftina te je zbog toga jedna od najjednostavnijih ekstrakcijskih tehnika. Za novije tehnike izolacije bioaktivnih spojeva često su potrebni posebni uvjeti izvođenja što otežava njihovu svakodnevnu primjenu te skupocjena aparatura, što ovoj metodi daje prednost jer zahtjeva niske troškove održavanja, jednostavna je te sigurna za upotrebu.



Slika 8. Shematski dijagram ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Sulaiman, 2016)

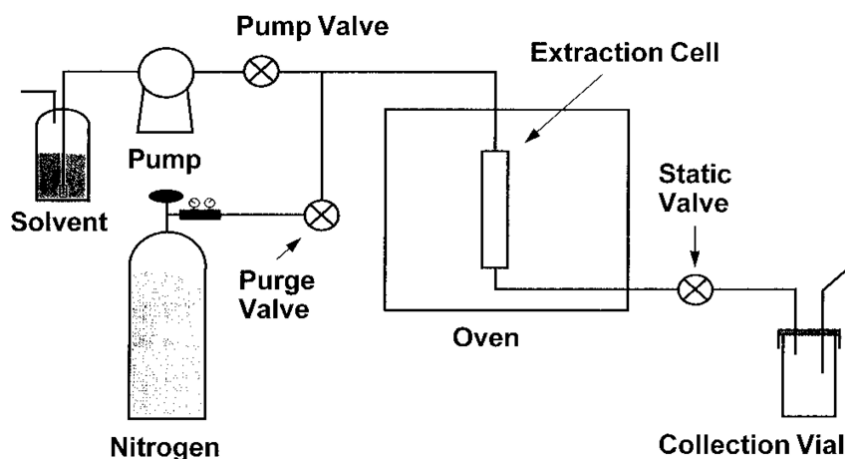
Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) je noviji postupak ekstrakcije u zatvorenom sustavu pri visokim tlakovima (35 – 200 bara) i temperaturama iznad temperature vrenja (50 - 200 °C) pri čemu se koriste organska otapala. Ekstrakcija traje kratko vremensko razdoblje (5 – 25 minuta) pri čemu se troše male količine otapala

(15-45 mL). To je metoda ekstrakcije različitih spojeva iz čvrste ili polučvrste matrice uzorka (Richter i sur., 1996; Mottaleb i Sarker, 2012). Povišena temperatura ubrzava ekstrakciju, a povišeni tlak održava otapalo ispod točke vrenja i u tekućoj fazi, omogućujući brzu, sigurnu i učinkovitu ekstrakciju ciljnih analita iz različitih matrica (Mottaleb i Sarker, 2012). Ekstrakcija pri povišenom tlaku i temperaturi poboljšava učinkovitost ekstrakcije, u usporedbi s ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku, zbog efekta topljivosti i prijenosa mase te utjecaja na površinsku napetost (Richter i sur., 1996).

Na povišenim temperaturama povećava se sposobnost otapala za otapanje analita. Povećanjem temperature ekstrakcije također se povećava i brzina difuzije. Povećanjem temperature od 25 do 150 °C može se povećati brzina difuzije otprilike 2-10 puta.

Ako se tijekom ekstrakcije dodaje svježe otapalo to rezultira poboljšanim prijenosom mase te time i povećanim stupnjem ekstrakcije. Uvođenjem svježeg otapala povećava se koncentracijski gradijent između otopine u stanici i površine uzorka matrice, što utječe na brži stupanj prijenosa mase (Richter i sur., 1996).

Utjecaj na površinsku napetost imaju temperatura i tlak. Pri povišenoj temperaturi slabe međumolekulske interakcije kao što su Van der Waalsove interakcije, vodikove veze i dipol-dipol veze. Povišena temperatura također smanjuje viskoznost otapala i površinsku napetost te se time povećava prodiranje otapala u matricu i pospješuje ekstrakcija. Visoki tlak omogućuje da otapalo prodre dublje u matricu uzorka time pospješujući ekstrakciju analita iz pora matrice (Richter i sur., 1996) i pomaže da se proces odvija brže (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 9. Shematski prikaz ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (Richter i sur., 1996)

Otapalo za ekstrakciju odabire se prema polarnosti, a trebalo bi biti što sličnije polarnosti spojeva koji se izoliraju. Za ASE ekstrakciju mogu se koristiti otapala različitog polariteta od n-heksana do metanola (Mottaleb i Sarker, 2012).

Pri višim temperaturama smanjuje se selektivnost primijenjene metode i izoliraju se različite grupe spojeva. Selektivnost se također smanjuje korištenjem više polarnih otapala, no može se koristiti niz različitih otapala, pri čemu je svako sljedeće polarnije od prethodnog, za dobivanje selektivnih ekstrakcija (Mottaleb i Sarker, 2012).

2.7. Postupci izolacije eteričnih ulja tršlje

Metode dobivanja eteričnog ulja destilacijom najčešće obuhvaćaju destilaciju vodenom parom, vodom i parom, a primjenjuju se i metode ekstrakcije uz primjenu otapala (Akdağ i Ozturk, 2019). Destilacija je najčešća metoda za odvajanje sekundarnih biljnih metabolita koji se odvajaju u različitim fazama i služi za odjeljivanje ili pročišćavanje komponenti iz njihovih smjesa. Odvajanje smjese destilacijom moguće je ako je jedan sastojak lakše hlapljiv, odnosno ima nižu temperaturu vrenja od drugog sastojka od kojeg ga odjeljujemo. Razdvajanje različitih bioaktivnih sastojaka u smjesi vrši se zagrijavanjem vodenog oblika smjese na temperaturu vrenja (različiti sastojci smjese imaju različita vrelišta) pri čemu tekućina prelazi u plinovitu fazu. Tvar koja ima nižu temperaturu vrelišta isparava prva. Nastale pare se kondenziraju i prikupljaju su u posebnim tikvicama te se dobiju destilati. U parnoj fazi ima više lakše hlapljivih komponenti nego u tekućoj fazi, u kojoj je veći sadržaj komponenti s višim vrelištem (Rakhee i sur., 2018; Anonymous 9; Anonymous 10).

Hladno prešanje se odnosi na svaki fizički proces u kojem se biološki materijal razbija ili drobi kako bi se oslobodilo eterično ulje. Ovim procesom se dobije emulzija ulje - voda koja se obično odvaja centrifugiranjem (Forde i sur., 2014).

2.7.1. Destilacija eteričnih ulja vodom, vodenom parom i parom

Za proizvodnju eteričnih ulja uglavnom se koristi destilacija vodenom parom biljke u svježem stanju. Koji će se postupak izolacije eteričnih ulja primijeniti ovisi o vrsti i svojstvu sirovine, kvalitativnom i kvantitativnom sastavu eteričnog ulja, a posebno o njegovoj primjeni (Rajić i sur., 2015).

Kod **destilacije vodom** biljni materijal je potpuno uronjen u vodu, a pare vode i eteričnog ulja isparavaju i kondenziraju se u kondenzatoru. Glavni nedostatak destilacije vodom je što nije moguća potpuna ekstrakcija eteričnog ulja. Kod ove metode komponente ulja poput estera osjetljive su na hidrolizu, dok su druge komponente poput acikličkih monoterpenskih ugljikovodika i aldehida osjetljive na polimerizaciju (Handa i sur., 2008). Djelovanje visoke temperature također negativno utječe na kvalitetu ekstrahiranog eteričnog ulja (Fornari i sur., 2012). Destilacija vodom vremenski dulje traje od destilacije vodenom parom ili destilacije vodom i parom (Handa i sur., 2008).

Destilacija vodenom parom temelji se na svojstvu mnogih spojeva da hlape zajedno s vodenom parom pri temperaturi ($<100^{\circ}\text{C}$) znatno nižoj od njihova vrelišta. U smjesi dviju ili više tekućina koje se ne miješaju svaka tekućina pokazuje vlastiti tlak para. Kada ukupan tlak para postane jednak atmosferskom tlaku smjesa će se destilirati.

Nedostaci destilacije vodenom parom su niska učinkovitost i selektivnost ekstrakcije, upotrebe velikih količina otapala i dugo vrijeme ekstrakcije. Na kvalitetu eteričnog ulja može utjecati hidroliza ili oksidacija, što se može dogoditi zbog dugog vremena ekstrakcije i/ili velike količine otapala (Stratakos i Koidis, 2016). Prednosti ove metode su što se količina pare može lako kontrolirati te nema termičkog raspadanja sastojaka eteričnog ulja (Handa i sur., 2008).

Destilacija vodom i parom je brža metoda od destilacije vodom i njome se bolje iskorištavaju eterična ulja, uz manje izraženu hidrolizu estera i polimerizaciju aldehida. Provodi se tako da se iznad sloja vode koja vrije postavi mrežica s biljnim materijalom, a voda ne dotiče biljni materijal, nego samo vodena para prolazi kroz njega.

Prednosti destilacije vodom i vodenom parom:

- veći prinos ulja
- komponente hlapljivog ulja su manje podložne hidrolizi i polimerizaciji
- gubitak polarnih sastojaka je minimaliziran ako se kontrolira refluks
- kvaliteta ulja dobivenog destilacijom vodenom parom je reproducibilna
- destilacija vodenom parom je brža od destilacije vodom pa je energetski učinkovitija (Handa i sur., 2008).

Nedostaci destilacije vodom i vodenom parom:

- zbog niskog tlaka pare, ulja s visokom točkom ključanja zahtijevaju veću količinu pare, a time je i duže trajanje destilacije
- biljni materijal postaje moker, što usporava destilaciju jer sama para mora ispariti vodu u materijalu kako bi mogla kondenzirati (Handa i sur., 2008).

Za izolaciju eteričnih ulja tršlje najčešće se koriste destilacija vodenom parom, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ekstrakcija Soxhlet metodom (Bampouli i sur., 2014).

2.7.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima je metoda prijenosa tvari koja se bazira na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području. Superkritična ekstrakcija je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi u superkritičnom stanju, na temperaturi iznad svoje kritične temperature (T_c) i na tlaku iznad svog kritičnog tlaka (p_c). Ekstrakcije superkritičnim fluidima imaju brojne prednosti u odnosu na klasične ekstrakcije s otapalima (Rajić i sur., 2015).

Ekstrakcijom superkritičnim fluidom značajno se ubrzava proces difuzije i time se ubrzava proces ekstrakcije. Fluid služi kao nosač i istovremeno se odvijaju ekstrakcija i separacija. Dolaskom u standardne uvjete, fluid ishlapi, pri čemu ostaje čisti ekstrakt.

Prednosti superkritičnog otapala su bolja difuzija, niža viskoznost i manja površinska napetost, čime je omogućeno njegovo bolje prodiranje u materijal iz kojeg se ekstrahira željena tvar. Također, ovim postupkom omogućena je visoka selektivnost i kontrola sposobnosti otapanja superkritičnog fluida promjenom tlaka i temperature te jednostavno uklanjanje otapala iz ekstrakta (Jokić i sur., 2011).

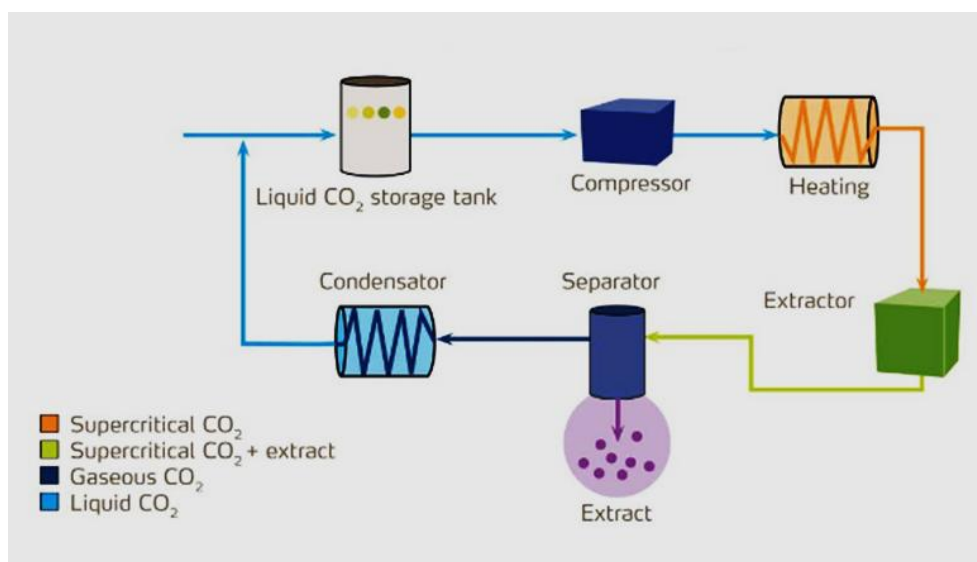
Kao superkritični fluid se najčešće koristi ugljični dioksid (CO_2) (Rajić i sur., 2015). CO_2 ima umjereno nizak kritični tlak (74 bara) i temperaturu (32°C), netoksičan je, nezapaljiv, dostupan u visokoj čistoći i relativno niskoj cijeni, te se lako uklanja iz ekstrakta. Superkritični CO_2 dobro je otapalo za lipofilne (nepolarne) spojeve, dok ima nizak afinitet s polarnim spojevima (Fornari i sur., 2012). CO_2 , kao otapalo, ima oznaku GRAS te se smatra potpuno sigurnim za primjenu u proizvodnji i preradi hrane (Jokić i sur., 2011).

Superkrični fluidi imaju veliku mogućnost primjene u mnogim procesima, ali većinom se primjenjuju za ekstrakcije eteričnih ulja i drugih supstanci koje se koriste u farmaceutskim proizvodima (Jokić i sur., 2011).

Eterična ulja mogu se lako ekstrahirati primjenom superkričnog CO₂ pri umjerenom tlaku i temperaturi. Za ekstrakciju eteričnih ulja iz biljne matrice potreban je relativno nizak tlak, 9-12 MPa. Mogu se primjenjivati i viši tlakovi kako bi se unaprijedio učinak kompresije na biljnu stanicu, što pospješuje prijenos mase i oslobađanje ulja iz stanice (Fornari i sur., 2012).

U usporedbi s klasičnom ekstrakcijom:

- Veći prinos ekstrakcije
- Sastav ekstrakta
- Antioksidacijska aktivnost
- Antimikrobna aktivnost
- Niže temperature ekstrakcije
- Nema kontaminacije otapalom
- Energetska efikasnost (istovremena ekstrakcija i separacija).



Slika 10. Ekstrakcija superkričnim fluidom (Anonymous 11)

2.8. Pregled dosadašnjih istraživanja ekstrakcije bioaktivnih spojeva tršlje

U literaturi nema velik broj istraživanja koja su bila fokusirana na usporedbu konvencionalnih i naprednih tehnika ekstrakcije i izolaciju eteričnih ulja.

Provedeno je istraživanje kojim je obuhvaćena izolacija BAM tršlje uz upotrebu vode kao otapala, a uspoređivan je i utjecaj temperature te je tako provedena ekstrakcija pri sobnoj temperaturi i zagrijanom vodom. Na temelju rezultata spomenutog istraživanja zaključeno je da se veći prinosi ukupnih fenola dobivaju pri maceraciji uz zagrijavanje. Uz maceraciju pri sobnoj temperaturi koncentracija ukupnih fenola iznosila je 759,45 $\mu\text{mol GAE/g}$ suhe tvari, a uz zagrijavanje gotovo dvostruko više tj. 1359,10 $\mu\text{mol GAE/g}$ suhe tvari (Gonçalves i sur. , 2013).

Usporedbom konvencionalne, MAE i UAE dokazano je da tehnika ekstrakcije značajno utječe na prinose fenolnih spojeva. Ekstrakcija svježeg lišća tršlje potpomognuta mikrovalovima s vodom kao otapalom pokazala je najveći prinos ekstrakcije (48,11 \pm 0,56% suhe tvari). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je imala prinos ekstrakcije 39,39 \pm 1,13% suhe tvari, a dobiveni ekstrakti su imali najveću antioksidacijsku aktivnost (Bampouli i sur., 2014). U opisanom istraživanju također je utvrđeno da na učinkovitost ekstrakcije znatno utječu polarna otapala voda i etanol, dok upotreba heksana ili etil acetata nije imala značajan utjecaj. Utjecaj otapala naročito do izražaja dolazi kod konvencionalne tehnike ekstrakcije.

Dahmoune i sur. (2014) su optimizirali ekstrakciju biološki aktivnih molekula iz lista tršlje s područja Alžira, a uspoređivali su prinose fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim primjenom naprednih tehnika poput MAE i UAE, te ekstrakte dobivene s konvencionalnom metodom ekstrakcije. Optimalni uvjeti za izolaciju BAM pomoću MAE bili su 46 % vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije od 60 s, omjer tekućine i krutine 28:1 i snaga valova od 17,86 W/mL, a pri navedenim uvjetima koncentracija fenolnih spojeva iznosila je 185,69 \pm 18,35 mg GAE/g st. Usporedbom sve tri tehnike, najveći prinosi dobiveni su primjenom MAE.

Pri izolaciji eteričnih ulja tršlje uglavnom se koristi destilacija vodom, vodenom parom ili parom, a među naprednije tehnike spadaju ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) ili ekstrakcija mikrovalovima bez upotrebe otapala. U istraživanju koje su proveli Congiu i sur. (2002), uspoređivani su prinosi eteričnog ulja pri izolaciji iz lista i bobica tršlje porijeklom iz dvije regije Sardinije (Costa Rey i Capoterra), a izolacija je provedena pomoću SFE i vodene destilacije. Dokazano je da nema značajne razlike u prinosima eteričnog ulja ovisno o

primijenjenoj tehnici ekstrakcije, dok su na količinu i sastav ulja više utjecali faktori poput lokaliteta s kojeg je biljka ubrana i dio biljke korišten za ekstrakciju. Najveće iskorištenje dobiveno je za eterično ulje lista tršlje dobiveno vodenom destilacijom u biljci iz regije Costa Rey u iznosu od 0,45 %, dok je uzorak porijeklom iz regije Capoterra imalo iskorištenje u iznosu od 0,28 %.

3. ZAKLJUČAK

Različiti dijelovi tršlje (*Pistacia lentiscus* L), poput lišća, plodova, grančica i korijena bogat su izvor različitih bioaktivnih spojeva među kojima se ističu fenolni spojevi te mono- i seskviterpeni kojima pripadaju najznačajnije sastavnice eteričnog ulja tršlje. Za učinkovitu ekstrakciju ciljanih bioaktivnih spojeva važno je odabrati učinkovitu tehniku ekstrakcije te definirati optimalne uvjete pri kojima se postižu najveći prinosi ekstrakcije BAM. Unatoč poznatim nedostacima konvencionalne tehnike ekstrakcije još uvijek imaju značajno mjesto u ekstrakciji bioaktivnih molekula iz raznih biljnih vrsta pa tako i iz tršlje. Uz konvencionalne sve više se ispituje opravdanost upotrebe naprednih tehnika i uspoređuju ostvareni prinosi, ali pri tome je važno tehnološki u obzir uzeti i ekonomski aspekt. Ovaj rad predstavlja pregled dijela tehnika koje će se koristiti kao dio istraživanja koja se provode u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“. Provođen će se optimiranje postupaka ekstrakcije BAM tršlje (ali i ostalih vrsta bilja) primjenom konvencionalnih i naprednih tehnika te usporedba učinkovitosti primijenjenih tehnika.

4. LITERATURA

Akbar S. (2020) Handbook of 200 Medicinal Plants A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications, Springer Nature. str.1443-1453

Akdağ A., Ozturk E. (2019) Distillation Methods of Essential Oils. Selcuk University Journal of Science Faculty 45 (1): 22-31

Anonymous 1, Izgled listova i plodova tršlje <<https://www.shutterstock.com/search/pistacia+lentiscus>> Pristupljeno 30. 6. 2020.

Anonymous 2, Narodna imena tršlje < <https://www.plantea.com.hr/trslja/>>, Pristupljeno 16.06.2020.

Anonymous 3, Strukturni prikaz hidroksibenzojeve kiseline <<https://www.lgcstandards.com/CN/en/4-Hydroxybenzoic-Acid/p/MM0045.01-0250>> Pristupljeno 30. 6. 2020.

Anonymous 4, Strukturni prikaz hidroksicimetne kiseline <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/800237?lang=en®ion=HR>> Pristupljeno 30. 6. 2020.

Anonymous 5, Podjela flavonoida <<https://pi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>>, Pristupljeno 14 lipnja 2020.

Anonymous 6, Perkolacija < <https://farmacija101.wordpress.com/21-perkolacija/>> Pristupljeno 05.07. 2020.

Anonymous 7, Perkolacija < <https://www.plantagea.hr/fitoterapija/ekstrakti-iscrpine-biljaka/>> Pristupljeno 05.07. 2020.

Anonymous 8, Frekvencija mikrovalova <<https://sk.pinterest.com/pin/105412447512832245/>> Pristupljeno 05.07. 2020.

Anonymous 9, Destilacija < <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=destilacija>>, Pristupljeno 23.06.2020.

Anonymous 10, Destilacija <<http://www.rudarska.hr/wp-content/uploads/2018/02/VJE%C5%BBBA-5-Metode-%C2%A6%C5%B9i%C3%AD%C2%A6%C3%A7enja-i-odjeljivanja-3.pdf>>, Pristupljeno 23.06.2020.

Anonymous 11, Ekstrakcija superkričnim fluidom <https://sfera2.sollab.eu/uploads/images/networking/Summer%20School%20presentations%202016/SummerSchool_2016_MI_Roldan.pdf> Pristupljeno 05.07. 2020.

Azaizeh H., Halahleh F., Abbas N., Markovics A., Muklada H., Ungar E.D., Landau S. Y. (2013) Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Veterinary Parasitology* 191(1-2): 44–50

Azib L., Debbache-Benaida N., Da Costa G., 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

Bampouli A., Kyriakopoulou K., Papaefstathiou G., Louli V., Krokida M., Magoulas K. G. (2014) Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1(3): 81-91

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 *P. Lentiscus* Leaves. *Free Radical Research* 37(4): 405-12

Benhammou N., Bekkara F.A., Kadifkova Panovska K. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology academic journals* 2(2): 022-028

Bimakr M., Ganjloo A., Zarringhalami S., Ansarian E. (2017) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Sci Biotechnol.* 26(6): 1481–1490

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(4): 472–478

Boudieb K., Slimane-Ait Kaki S. A., Amellal-Chibane H. (2019) Traditional uses, phytochemical study and morphological characterization of *Pistacia lentiscus* L. fruits from three areas of northern Algeria. *Journal of Applied Biosciences* 135: 13788 – 13797

Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Salehi Surmaghi M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi R. (2013) Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal* 2013(1): 219815

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(3): 1120–1130

Congiu R., Danilo F., Marongiu B., Piras A. (2002) Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal* 17(4): 239-244

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

Dogan Y., Baslar S., Aydin H., Mert H. H. (2003) A study of the soil-plant interactions of *Pistacia lentiscus* L. distributed in the western Anatolian part of Turkey. *Acta Botanica Croatica* 62(2): 73–88

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

Forde C. J., Meaney M., Carrigan J. B., Mills C., Boland S., Hennon A. (2014) Biobased Fats (Lipids) and Oils from Biomass as a Source of Bioenergy U: *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Gupta V. K., Tuohy M. G., Kubicek C. P., Saddler J., Xu F., ur., Elsevier Inc. str. 185-201

Fornari T., Vicente G., Vázquez E., García Risco M. R., Reglero G. (2012) Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* 1250: 34-48

Gonçalves S., Gomes D., Costa P., Romano A. (2013) The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind Crop Prod.* 43, 465–471. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.066

Gunturu B. (2018) Review on the Extraction Methods of Crude oil from all Generation Biofuels in last few Decades. *IOP Conference Series Materials Science and Engineering* 330(1): 012024

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, str. 40-47

Hernández Y., Gloria Lobo M., Mónica González M. (2009) Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry* 114(2): 734-741

Jagatić Korenika A.-M., Batistić I., Jeromel A. (2017) Utjecaj hladne maceracije na kakvoću vina Grk. *Glasnik Zaštite Bilja* 40: 5

Jokić S., Nagy B., Velić D., Bucić-Kojić A., Bilić M. (2011) Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkričnim CO₂ - pregledni rad. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3(2): 39-54

Kaufmann B., Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical analysis* 13: 105-113

Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T., Lim S. M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res.* 61(1): 1361779

Kothari V., Gupta A., Naraniwal M. (2012) Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts: A comparative study, 1. izd., Lambert Academic Publishing. str. 16-20

Kurtagić H. (2017) Polifenoli i flavonoidi u medu, *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* 6(1): 28-35

Landau S., Muklada H., Marcovics A., Azaizeh H., (2014) Traditional uses of *Pistacia lentiscus* in veterinary and human medicine. *Journal of Applied Biosciences* 135: 13788 – 13797

Lloyd P. J., van Wyk J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 1-24.

Lo Presti M., Sciarrone D., Crupi M.L., Costa R., Ragusa S., Dugo G., Monedello L. (2008) Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 249 -257

Longo L., Scardino A., Vasapollo G. (2007) Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(3): 360-364

Mariya John K. M., Vijayan D., R. Raj Kumar R., Premkumar R. (2006) Factors Influencing the Efficiency of Extraction of Polyphenols from Young Tea Leaves. *Asian Journal of Plant Sciences* 5(1): 123-126

Mazzutti S., Pedrosa R. C., Salvador Ferreira S. R. (2020) Green processes in Foodomics. Supercritical Fluid Extraction of Bioactives. U: Reference Module in Food Science. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22816-3

Mecherara-Idjeri S., Hassani A., Castola V., Casanova J. (2008) Composition and Chemical Variability of the Essential Oil from *Pistacia lentiscus* L. Growing Wild in Algeria: Part II: Fruit Oil. *Journal of Essential Oil Research* 20(2): 104-107

Mehenni C., Atmani-Kilani D., Dumarcay S., 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(3): 653-669

Mezni F., Martine L., Khouja M. L., Berdeaux O., Khaldi A. (2020) Identification and quantitation of tocopherols, carotenoids and triglycerides in edible *Pistacia lentiscus* oil from Tunisia. *Journal of Materials and Environmental Sciences* 11(1): 79-84

Mottaleb M. A., Sarker S. D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. *Methods in Molecular Biology* 864: 75-87

Murkovic M. (2003) Phenolic compounds U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2. izdanje, Caballero B., Finglas P., Toldra F., ur., Academic Press, str. 4507-4514.

Nagalingam A. (2017) Drug Delivery Aspects of Herbal Medicine. U: Japanese Kampo Medicines for the Treatment of Common Diseases: Focus on Inflammation, 1. izd., Arumugam S., Watanabe K., ur., Academic Press, str. 143-164

Ozcan T., Akpinar-Bayizit A., Yilmaz-Ersan L., Delikanli B. (2014) Phenolics in Human Health. International Journal of Chemical Engineering and Applications 5: 393-96

Pachi K.V., Mikropoulou E. V., Gkiouvetidis P., Siafakas K., Argyropoulou A., Angelis A., Mitakou S., Halabalaki M. (2020) Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of Chios Mastic Gum (*Pistacia Lentiscus* Var. Chia, Anacardiaceae): A Review. Journal of Ethnopharmacology 254: 112485

Pathak S., Kesavan P., Banerjee A., Banerjee A., Sagdicoglu Celep G., Bissi L., Marotta F. (2018) Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, 2. izd., Academic Press. str. 347-359.

Pathak S., Kesavan P., Banerjee A., Banerjee A., Sagdicoglu Celep G., Bissi L., Marotta F. (2018) Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, 2. izd., Academic Press. str. 441-452.

Rajić M., Bilić M., Aladić K., Šimunović D., Pavković T., Jokić S. (2015) Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. Glasnik Zaštite Bilja 38: 6

Rakhee J., Mishra J., Sharma R. K., Misra K. (2018) Characterization Techniques for Herbal Products U: Management of High Altitude Pathophysiology, 1.izd., Misra K., Sharma P., Bhardwaj A., ur., Academic Press. str. 171-202

Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L. (1996) Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. Analytical Chemistry 68(6):1033-1039

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* L. Phytochemical analysis 13(2): 79–86

Serifi I., Tzima E., Bardouki H., Lampri E., Papamarcaki T. (2019) Effects of the Essential Oil from *Pistacia lentiscus* Var. chia on the Lateral Line System and the Gene Expression Profile of Zebrafish (*Danio rerio*). Molecules 24(21): 3919

- Shirahigue L. D., Ceccato-Antonini S.R. (2020) Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Food technology* 50: 4
- Stratakos A., Koidis A. (2016) Chapter 4 - Methods for Extracting Essential Oils U: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 1. izd., Preedy V., ur., Academic Press, str. 31-38
- Sulaiman A. Z. (2016) Effect of temperature and sonication on the extraction of gallic acid from *Labisia Pumila* (Kacip Fatimah). *Journal of Engineering and Applied Sciences* 11(4): 2193-2198
- Swanson B. G. (2003) Tannins and polyphenols. U: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. izd., Trugo L. i Finglas P. M., ur., Academic Press, str. 5729-5733
- Tolić, I. (2003) Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda *Pistacia*. *Šumarski list* 9-10: 501-507.
- Trabelsi H., Lajnef H.B., Arfa K.B., Boukhchina S. (2016) Phenolic Compounds Characterization from *Pistacia lentiscus* (lentisc) Fruit. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(8): 1-8
- Trablesi H., Renaud J., Mayer P., Boukhchina S. (2014) Triacylglycerol and Glycerophospholipid Identification and Accumulation During Ripening of *Pistacia lentiscus* L. (Lentisc) Fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91: 1189–1196
- Veggi P. C., Martinez J., Meireles M. A. A., (2012) *Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series*, 1. izd., Chemat F. Cravotto G., ur., Springer, str. 15-52.
- Watson R., Bonetti F., Brombo G., Zuliani G. (2017) *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, 1. izdanje, Academic Press. str. 211-232
- Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C. (2018) Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medical Journal* 13: 20
- Zitouni A., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Toul F., Bekkara F. A. (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(4): 627-633

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.

Lea Jankov

ime i prezime studenta