

Antioksidacijska aktivnost i određivanje ukupnih fenola mikrovalnih ekstrakata biljke *Borago officinalis* L.

Rašić, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:529382>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Anja Rašić
58220539**

**ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA
MIKROVALNIH EKSTRAKATA BILJKE *Borago officinalis L.***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna kemija

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: HRZZ-IP-2022-10-1837

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Antioksidacijska aktivnost i određivanje ukupnih fenola mikrovalnih ekstrakata
biljke *Borago officinalis* L.
Anja Rašić, 58220539**

Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je ispitati antioksidacijsku aktivnost i koncentracije ukupnih fenola ekstrakata biljke *Borago officinalis* L., dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom. Ekstrakcije su provedene s deionoziranom vodom te 30 % -tnom, 70 % -tnom vodenom otopinom etanola i 96 % -tnim etanolom pri temperaturama od 40, 60 i 80 °C. Antioksidacijska svojstva ekstrakata ispitivana su DPPH i FRAP metodom, primjenom UV/VIS spektroskopije. Koncentracije ukupnih fenola također su određivane primjenom UV/VIS spektroskopije pomoću Folin – Ciocalteu reagensa. Najvišu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola, a mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 80 °C. Taj uzorak ujedno pokazuje i najvišu antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom. Najvišu antioksidacijsku aktivnost određivanu FRAP metodom pokazuje ekstrakt gdje je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola te je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 80 °C. 96 % -tni etanolni ekstrakti imaju najnižu antioksidacijsku aktivnost i najmanji sadržaj fenola određen svim trima metodama. Na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata *Borago officinalis* L. utječu temperatura ekstrakcije i otapalo korišteno za ekstrakciju.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, polifenoli, DPPH metoda, FRAP metoda, *Borago officinalis* L.

Rad sadrži: 35 stranica, 23 slike, 12 tablica, 15 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

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

Datum obrane: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Antioxidant activity and determination of total phenols in microwave extracts of the plant *Borago officinalis L.*

Anja Rašić, 58220539

Abstract:

The aim of this thesis was to investigate the antioxidant activity and total phenol concentrations of *Borago officinalis L.* plant extracts obtained by microwave extraction. Extractions were performed with deionized water and 30 %, 70 %, 96 % ethanol at temperatures of 40, 60, and 80 °C. The antioxidant properties of the extracts were examined using the DPPH and FRAP methods, employing UV/VIS spectroscopy. Total phenol concentrations were also determined using UV/VIS spectroscopy and the Folin-Ciocalteu reagent. The highest concentration of total phenols was found in the sample where 70 % ethanol was used as the solvent, and microwave extraction was conducted at 80 °C. This sample also exhibited the highest antioxidant activity measured by the DPPH method. The highest antioxidant activity determined by the FRAP method was shown by the extract where 30 % ethanol was used as the solvent, and microwave extraction was conducted at 80 °C. The 96% ethanol extracts showed the lowest values determined by all three methods. The antioxidant activity of *Borago officinalis L.* extracts is influenced by the extraction temperature and the solvent used for extraction.

Keywords: antioxidant activity, polyphenols, DPPH assay, FRAP assay, *Borago officinalis L.*

Thesis contains: 35 pages, 23 figures, 12 tables, 15 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Filip Šupljika, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance: Filip Šupljika, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: June 17, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Boražina (lat. <i>Borago officinalis</i>)	2
2.2. Mikrovalno zračenje	2
2.3. UV/VIS Spektroskopija	5
2.4. Fenolni spojevi i antioksidansi	6
2.5. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti	8
2.5.1. DPPH metoda	9
2.5.2. FRAP metoda	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Biljni materijali	11
3.1.2. Kemikalije	11
3.1.3. Aparatura i pribor	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem	12
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	13
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	14
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
5. ZAKLJUČCI	33
6. POPIS LITERATURE	34

1. UVOD

Boražina je jednogodišnja biljka s debelim i mekim stabljikama te zvjezdolikim cvjetovima. Potječe s Bliskog istoka, ali se proširila na različita područja na Zemlji, gdje joj odgovara umjerena klima. Od dijelova biljke mogu se iskoristiti listovi, cvjetovi i sjemenke, a pretežno se koristi u kulinarstvu.

Mikrovalna ekstrakcija je metoda koja se sve više koristi u odnosu na tradicionalne metode ekstrakcije. Prilikom izvođenja ekstrakcije na ovaj način, za razdvajanje komponenti koristi se mikrovalno zračenje koje spada u neionizirajuće zračenje te čini dio elektromagnetskog spektra s frekvencijama od oko 2450 MHz. Ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem brže su od tradicionalnih ekstrakcija te pokazuju bolje iskorištenje procesa.

UV/VIS spektroskopija je jednostavna i ekonomična metoda koja koristi zračenje različitih valnih duljina kako bi se odredile određene značajke uzoraka. Metoda se provodi pomoću UV/VIS spektrofotometra, a svjetlost koja se koristi za interakciju s uzrocima spada u vidljivi i ultraljubičasti dio elektromagnetskog spektra.

Kao i svaka druga biljka, boražina također sadrži polifenole koji imaju antioksidativna svojstva. Antioksidansi su tvari koje, dodane u maloj količini, mogu odgoditi, usporiti ili inhibirati autooksidaciju nekih drugih molekula. Postoje sintetički i prirodni antioksidansi, a njihova antioksidacijska aktivnost u pojedinim uzorcima može se odrediti pomoću više različitih metoda. Jedna od metoda za određivanje ukupnih polifenola u uzorku jest metoda koja kao reagens koristi Folin – Ciolcateu reagens (FCR). Metoda se bazira na prijenosu elektrona iz fenolnih spojeva na FCR, a rezultati se iskazuju kao ekvivalenti galne kiseline. Metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka uz pomoć DPPH radikala, temelji se na kapacitetu antioksidansa da neutraliziraju DPPH radikal. Metoda je jedna od najstarijih, često se koristi te je vrlo jednostavna. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka, mjeri sposobnost antioksidansa da reducira kompleks željezovih Fe^{3+} iona u kompleks Fe^{2+} iona. Metoda se provodi u kiselom području pH vrijednosti, a rezultati se prikazuju kao ekvivalenti askorbinske kiseline.

Cilj ovoga rada bio je navedenim metodama odrediti antioksidacijsku aktivnost i koncentracije ukupnih fenola u mikrovalnim ekstraktima boražine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Boražina (lat. *Borago officinalis*)

Boražina je snažna, lisnata, jednogodišnja biljka s debelim i mekim stabljikama koje nose velike listove i skupine visećih, zvjezdolikih cvjetova (Slika 1.). Pretpostavlja se da potječe s Bliskog istoka, ali prirodno se javlja i na području zapadnog Mediterana te južne Europe. Proširila se na različita geografska područja s umjerenom klimom, gdje se vrlo često uzgaja u vrtovima kao ljekovito bilj (Mabberley i D. J., 2008). Razmnožava se putem sjemena, a može spontano klijeti i postati invazivna. Listovi i cvjetovi se mogu brati u intervalima tijekom sezone, a sjemenke se skupljaju mehanički zbog ekstrakcije ulja (Mahamdi i sur., 2009). Mladi, svježe ubrani listovi imaju okus sličan krastavcu te se koriste u kulinarnstvu kao dodatak salatama i juhama, međutim karakterističan okus brzo nestaje kada se listovi termički obrađuju (Mabberley i D. J., 2008). U Njemačkoj, boražina se koristi kao jedan od glavnih sastojaka Frankfurtskog zelenog umaka (Frankfurter Grüne Sauce). Ulje sjemenki boražine, poznato kao i „ulje zvjezdastog cvijeta“, postalo je popularan prehrambeni dodatak i jelo koje se koristi za smanjenje simptoma ekcema i stresa. Ovo ulje bogato je gama-linolenskom kiselinom (GLA), esencijalnom masnom kiselinom (Mahamdi i sur., 2009).

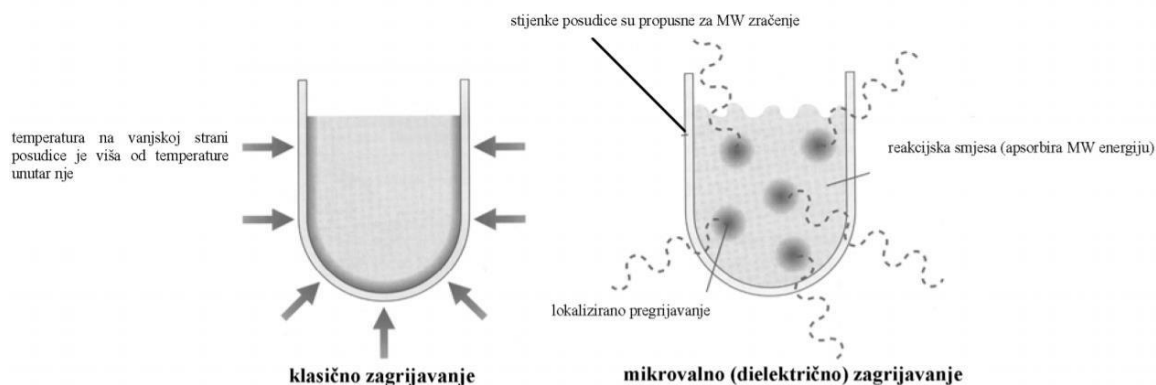


Slika 1. Listovi i cvjetovi boražine (Anonymous 1, 2009).

2.2. Mikrovalno zračenje

Mikrovalno ili dielektrično zračenje danas se koristi kao alternativa tradicionalnom zagrijavanju, a temelji se na sposobnosti materijala (čvrstih tvari i tekućina) da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje i pretvaraju ga u toplinu. Neke od značajnih prednosti, koje mikrovalno zračenje pokazuje u usporedbi s tradicionalnim zagrijavanjem, odnose se na skraćivanje vremena reakcija, s nekoliko sati i dana na nekoliko minuta i sekunda (Slika 2.),

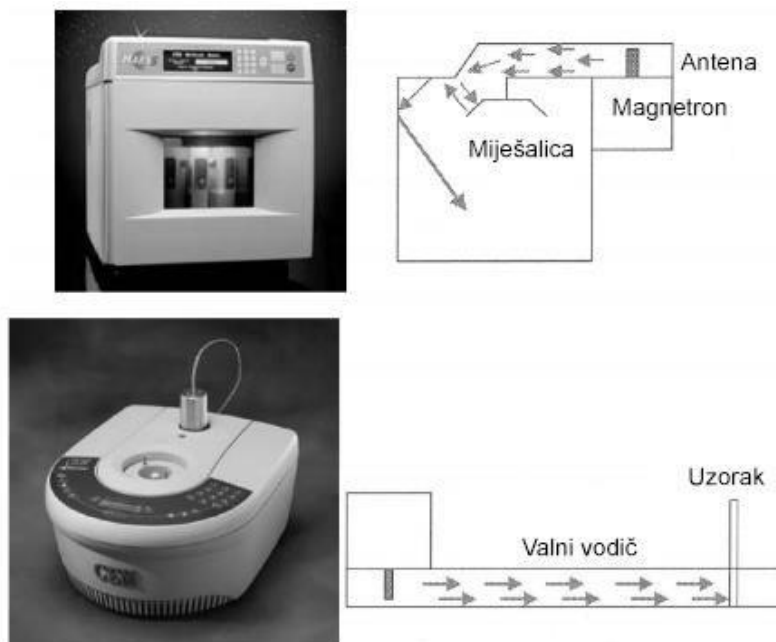
bolje iskorištenje procesa i smanjenje nusprodukta. Mikrovalnim zračenjem je također moguće provesti i neke reakcije koje se ne odvijaju tradicionalnim putem (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).



Slika 2. Shematski prikaz zagrijavanja uzoraka klasičnim i MW-zračenjem (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog spektra s frekvencijama od oko 2450 MHz, čime spadaju u raspon frekvencija od 1 GHz do 300 GHz. Pripadaju valovima koji prenose televizijske i radijske signale. Oni su radiovalovi s frekvencijama od 0,3 do 300 GHz. Većina laboratorijskih uređaja radi pri frekvenciji od 2,45 GHz. Zbog svoje elektromagnetske prirode, mikrovalovi se sastoje od električnog i magnetskog polja koja su međusobno okomita. Električno polje omogućava zagrijavanje putem dva istovremena mehanizma, rotacije dipola i ionske provodnosti (Delazar i sur., 2012). Mikrovalovi, zajedno sa radio i televizijskim valovima te infracrvenim zrakama i zrakama vidljive svjetlosti spadaju u neionizirajuće zračenje, dok ultraljubičaste, rendgenske i gama zrake spadaju u ionizirajuće zračenje koje je izuzetno opasno za zdravlje (Blekić i sur., 2011). Mikrovalovi su se prvo počeli primjenjivati u prehrambenoj industriji 70-ih godina prošloga stoljeća. Prvi uređaji koji su se koristili u pokusima, a koristili su mikrovalno zračenje, bile su kućne mikrovalne pećnice. Glavni nedostatak njihove primjene bila je promjenjiva snaga zračenja, što je za posljedicu imalo neravnomjerno zagrijavanje reakcijske smjese. Danas su na tržištu dostupna dva tipa mikrovalnih reaktora koji se koriste u praksi. Višefunkcijski mikrovalni reaktori imaju veliko kućište, unutar kojeg se mikrovalno zračenje širi u svim smjerovima reflektiranjem od stijenki kućišta (Slika 3.), dok se rotiranjem posudica s reakcijskim smjesama postiže homogena raspodjela polja. Jednofunkcijski reaktori imaju manja kućišta te se mikrovalno zračenje prenosi kroz definiran valovod i tako se usmjerava na reakcijsku posudicu koja se nalazi na točno određenoj udaljenosti od izvora zračenja. Odabir tipa reaktora ovisi o tome što se

pokusom želi postići i o količinama reaktanata, a ne o tipu reakcije koja se provodi (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).



Slika 3. Shematski prikaz višefunkcijskog i jednofunkcijskog kućišta uz fotografije oba tipa mikrovalnih reaktora (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

Mikrovalno zračenje ima višestruku upotrebu u prehrambenoj industriji te se sve češće koristi i kod postupaka ekstrakcija. Ekstrakcija je brz i učinkovit postupak razdvajanja tvari, a upotreba mikrovalova pri ekstrakciji počela je 1980-ih te je mikrovalna ekstrakcija sada postala jedna od popularnijih i ekonomičnijih metoda ekstrakcije (Delazar i sur., 2012). Prednosti mikrovalne ekstrakcije nad tradicionalnim metodama ekstrakcije su mnoge. Mikrovalnom ekstrakcijom je proces ekstrakcije ubrzan, potrebno je manje otapala, veći je prinos ekstrakcije te su troškovi niži. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka istovremeno i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola (Blekić i sur., 2011). Dostupne su dvije vrste sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija provođena u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija provođena u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Kao i kod tradicionalnih metoda ekstrakcije, učinak mikrovalne ekstrakcije ovisi o više različitih čimbenika. Jedan od tih čimbenika je temperatura. Povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom, međutim, također povećava rizik od degradacije termolabilnih komponenti. Stoga je potrebno pronaći ravnotežu između prinosa ekstrakcije i očuvanja stabilnosti pojedinih komponenti (Delazar i sur., 2012). Tlak direktno ovisi o temperaturi i omogućava zagrijavanje iznad temperature vrenja. Veličina čestica uzoraka je također jedan od čimbenika koji utječu na učinak mikrovalne ekstrakcije.

Smanjenjem veličine čestica, uzorku se povećava površina što omogućuje bolje prodiranje mikrovalova. Snaga mikrovalnog zračenja korištenog u postupku ekstrakcije treba biti ispravno podešena kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za postizanje odgovarajuće temperature. Najvažniji čimbenik mikrovalne ekstrakcije je izbor otapala. Pri odabiru otapala važno je uzeti u obzir topljivost ciljnih komponenti, interakcije između otapala i matriksa te sposobnost otapala da apsorbira mikrovalno zračenje (Delazar i sur., 2012). Odabrano otapalo treba efikasno apsorbirati mikrovalno zračenje, imati visoku dielektričnu konstantu, biti visoko selektivno prema željenoj komponenti te ga treba biti u dovoljnoj količini da prekrije cijeli uzorak tijekom provođenja postupka (Delazar i sur., 2012). S obzirom na sposobnost apsorpcije mikrovalnog zračenja, otapala se dijele na visoko, srednje i nisko apsorbirajuća otapala. Najčešće korišteno visoko apsorbirajuće otapalo je etanol (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005).

2.3. UV/VIS Spektroskopija

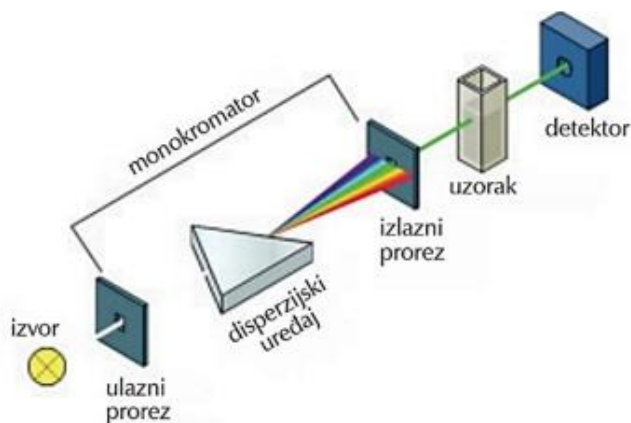
Spektroskopske metode koriste zračenje različitih valnih duljina za interakciju s uzorcima (Hofmann, 2010). Vidljivi dio spektra spada u područje elektromagnetskog zračenja između 400 i 750 nm, dok se ultraljubičasto zračenje nalazi u rasponu valnih duljina od 10 do 400 nm. Kombinacija ova 2 dijela elektromagnetskog zračenja, najčešće je korištena tehnika u analitičkom određivanju svojstava određenih uzoraka. Elektronski prijelazi u molekulama mogu se podijeliti prema sudjelujućim molekulskim orbitalama (Hofmann, 2010). Od 4 moguća prijelaza ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$), samo se 2 mogu potaknuti zračenjem iz UV/VIS spektra. U prijelaze koji se mogu potaknuti zračenjem iz UV/VIS spektra spadaju $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$. Prijelazi $n \rightarrow \sigma^*$ i $\sigma \rightarrow \sigma^*$ zahtijevaju veće energije (Pavia i sur., 2001). Apsorpcija zračenja proporcionalna je broju molekula u uzorku koje su sposobne apsorbirati zračenje određene valne duljine, više molekula = veća apsorpcija.

Količina apsorbiranog zračenja definira se Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon c l \quad (1)$$

pri čemu A označava apsorbanciju, I_0 označava snagu upadnog zračenja, dok I označava snagu zračenja nakon prolaska kroz uzorak debljine l i molarne koncentracije c , a ϵ označava molarni apsorpcijski koeficijent koji je značajan za tvar koja apsorbira zračenje (Pavia i sur., 2001). Lambert-Beerov zakon vrijedi samo kada je prisutna jedna vrsta molekula koja uzrokuje promatranu apsorpciju. Uobičajeni UV/VIS spektrofotometar sastoji se od nekoliko glavnih dijelova (Slika 4.). Kao izvor svjetlosti najčešće se koristi deuterijska žarulja koja emitira svjetlost potrebnih valnih duljina. Monokromator, prizma ili rešetka, smješten je između izvora svjetlosti i uzorka, a njegova zadaća je da snop svjetlosti rasprši na potrebne valne duljine. Svjetlost prolazi kroz uzorak i pada na detektor, koji zatim detektira transmitiranu svjetlost, tj

svjetlost koja se nije apsorbirala (Pavia i sur., 2001). Kivete korištene za eksperimente moraju biti od precizno odabranih materijala, kako ne bi apsorbirale svjetlost u istraživanom području i time kompromitirale rezultate. Kivete od stakla ili plastike pogoduju za elektromagnetsko zračenje koje spada u vidljivi dio spektra, ali zato su izrazito nepogodne za provođenje eksperimenata s elektromagnetskim zračenjem koje pripada ultraljubičastom dijelu spektra pošto staklo apsorbira ultraljubičasto zračenje. Iz navedenih razloga, u ovakvim eksperimentima najčešće se koriste kvarcne kivete. Posebnu je pozornost potrebno posvetiti i odabiru otapala koje će se koristiti u navedenim eksperimentima. Otapalo također ne smije apsorbirati svjetlost jednake valne duljine kao i uzorak čija se apsorbancija mjeri. (Pavia i sur., 2001).

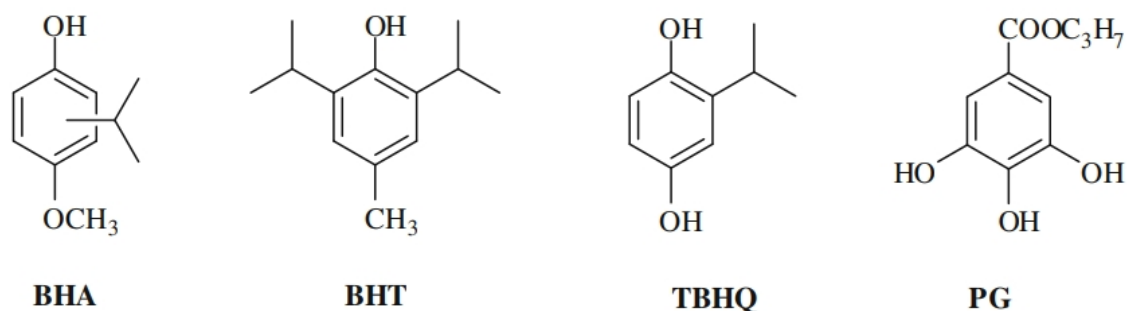


Slika 4. Glavni dijelovi UV/VIS spektrofotometra (PerkinElmer).

2.4. Fenolni spojevi i antioksidansi

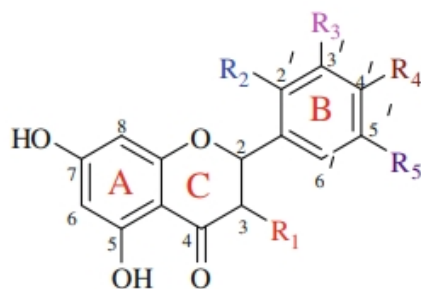
Antioksidansi su tvari koje čak i u niskim koncentracijama mogu znatno usporiti ili potpuno zaustaviti oksidaciju supstrata (Gülcin i Alwasel, 2023). Oni doniraju elektrone slobodnim radikalima kako bi ih onesposobili i neutralizirali, smanjujući oksidativna oštećenja u biološkim procesima (Gülcin i Alwasel, 2023). Pojam slobodnog radikala se najčešće povezuje s oksidativnim stresom. Oksidativni stres je relativno nov pojam koji se koristi u medicini, a javlja se kada u stanici postoji višak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje proizvode mitohondriji. Klasifikacija antioksidansa temelji se na njihovom mehanizmu zaštite te je važna prilikom odabira najprikladnije metode istraživanja (Amorati i Valgimigli, 2015). Antioksidansi se mogu podijeliti u 2 velike skupine, a to su sintetski i prirodni antioksidansi. Od umjetnih antioksidansa najčešće se koriste fenolni spojevi poput butiliranog hidroksianizola (BHA), butiliranog hidroksitoulena (BHT), *tert*-butilhidrokinona (TBHQ) i propil-galata (PG) (Slika 5.). Ovi sintetski antioksidansi se najčešće koriste u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, ali zakonski propisi ograničavaju upotrebu BHA i BHT zbog sumnji na njihove toksične i kancerogene utjecaje. Upravo zbog toga, postoji sve veći interes za prirodnijim i sigurnijim antioksidansima.

1980. -ih su izolirani prirodni antioksidansi kao alternativa umjetnima (Gülcin, 2012).



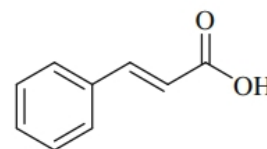
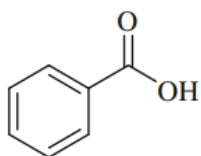
Slika 5. Kemijske strukture najčešće upotrebljavanih sintetskih antioksidansa (Gülcin i Alwasel, 2023).

Najpoznatiji prirodni antioksidansi su vitamin C, tokoferoli, karotenoidi i flavonoidi. Svaka od ovih skupina antioksidansa, osim vitamina C, sastoji se od više strukturno različitih spojeva (Gülcin, 2012). Askorbinska kiselina (vitamin C) smatra se jednim od najjačih i najmanje toksičnih prirodnih antioksidansa. Tokoferoli su vrsta kemijskih spojeva od kojih mnogi imaju aktivnost vitamina E. Dijele se na tokoferole i tokotrienole, a unutar svake grupe postoje 4 izomera (α , β , γ , δ), što ukupno čini 8 izomera tokoferola. Najznačajniji je α -tokoferol, vitamin topljiv u mastima koji se nalazi u vanjskoj membrani stanica i staničnim organelima, gdje prekida lanac oksidacije i štiti membrane od daljnjih oštećenja (Gülcin, 2012). Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka, koji su prisutni u različitom voću i povrću poput lubenice, grožđa, soje, luka... Također se mogu pronaći i u kavi, crnom vinu i nekim sokovima (Lang i sur., 2022). Polifenoli se razlikuju po kemijskim strukturama i položaju supstituenata, što utječe na njihovu antioksidativnu aktivnost. Fenolne hidroksilne skupine imaju ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, a glavni faktori su broj i položaj tih skupina (Lang i sur., 2022). S obzirom na kemijsku strukturu, mogu se podijeliti na flavonoide, fenolne kiseline, tanine... Flavonoidi su vrlo učinkoviti antioksidansi te se smatra da pružaju zaštitu od kardiovaskularnih bolesti. Često se nalaze u biljkama, a nastaju iz aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina te iz malonata (Gülcin, 2012). Temeljna struktura flavonoida je flavanska jezgra, koja ima 15 ugljikovih atoma raspoređenih u 3 prstena, C6-C3-C6 (Slika 6.).



Slika 6. Temeljna kemijska struktura flavonoida (Gülcin, 2012).

Fenolne kiseline su organski spojevi koji čine veliki udio fenolnih spojeva. Mogu se pronaći u žitaricama, kikirikiju i bobičastom voću, a sintetiziraju se tijekom rasta biljaka (Gülcin, 2012). S obzirom na kemijsku strukturu dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Slika 7.). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina i njihovih derivata ovisi o položaju i broju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu, mjestu vezanja i međusobnom položaju tih skupina. Hidroksicimetne kiseline su bolji antioksidansi od hidroksibenzojeve kiseline.



Slika 7. Podjela fenolnih kiselina prema kemijskoj strukturi na hidroksibenzojeve (lijevo) i hidroksicimamične (desno) (Gülcin, 2012).

2.5. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Posljednjih nekoliko desetljeća sve se više istražuju antioksidativna svojstva hrane zbog poznatih utjecaja kisikovih slobodnih radikala na zdravlje ljudi. Upravo iz tih razloga došlo je do razvijanja novih metoda za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta hrane (Gülcin, 2012). Općenito, metode za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta hrane mogu neutralizirati slobodne radikale putem 2 mehanizma te su podijeljene u 2 glavne skupine: metode temeljene na SET (prijenos jednog elektrona) reakcijama i metode temeljene na HAT (prijenos vodikovog atoma) reakcijama (Gülcin, 2012). Bez obzira na korištenu metodu, rezultat je isti, ali kinetika i potencijal za sporedne reakcije nisu. Metode temeljene na HAT-u detektiraju sposobnost antioksidansa da neutralizira slobodne radikale doniranjem vodikovih atoma. Prisutnost reducirajućih agensa, u koje spadaju i metali, predstavlja komplikacije u HAT metodama te može dovesti do lažnih rezultata. Metode temeljene na SET-u detektiraju sposobnost antioksidansa da prenese jedan elektron kako bi reducirao bilo koji spoj, uključujući metale, karbonilne skupine i radikale (Gülcin, 2012). Neke od najkorištenijih SET metoda su: metoda određivanja ukupnih fenola pomoću Folin - Ciolcateau reagensa (FCR),

FRAP metoda za određivanje sposobnosti antioksidansa da reducira kompleks željezovih Fe³⁺ iona, neutralizacija slobodnih radikala uz DPPH reagens (Gülcin, 2012). Tijekom godina, metoda određivanja ukupnih fenola pomoću FCR korištena je za određivanje ukupnih fenola u prirodnim izvorima. Ova metoda se temelji na prijenosu elektrona iz fenolnih spojeva na FCR u alkalnom mediju te je vrlo jednostavna i široko prihvaćena metoda. Metoda djeluje tako da mjeri količinu testne tvari koja je potrebna za inhibiciju oksidacije reagensa. Kao standardni referentni spoj u metodi koristi se galna kiselina (GAE) te se rezultati iskazuju kao ekvivalenti galne kiseline. Ova metoda je jednostavna i može biti korisna u karakterizaciji i standardizaciji uzoraka. Ipak, reakcija je sporija pri kiselom pH i nedostaje joj specifičnosti (Gülcin, 2012).

2.5.1. DPPH metoda

2,2 –Dphenyl–1– picrylhydrazyl (DPPH) metoda je jedna od najstarijih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka (Gülcin, 2012). DPPH radikal otkrili su Goldschmidt i Renn 1922. godine, a 1950. -ih je metodu razvio Blois (Lang i sur., 2022). Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju kapaciteta antioksidansa da neutraliziraju DPPH radikal. Svježe pripremljena otopina DPPH radikala je tamno ljubičasta te maksimum apsorpcije doseže pri 517 nm. Ta ljubičasta boja obično nestaje kada je u uzorku prisutan antioksidans (Gülcin, 2012). Neki kemijski spojevi vrlo brzo reagiraju s DPPH radikalima. Fenolni spojevi su posebno reaktivni i značajni u reakcijama s DPPH (Gülcin i Alwasel, 2023). Antioksidativna svojstva fenolnih spojeva (ArOH) prikazana su sljedećom reakcijom:



Fenolni spojevi djeluju kao donori vodika što dovodi do transformacije DPPH· u DPPH-H te do promjene boje otopine, čime je onda potvrđena njihova prisutnost antioksidansa u uzorku (Gülcin i Alwasel, 2023).

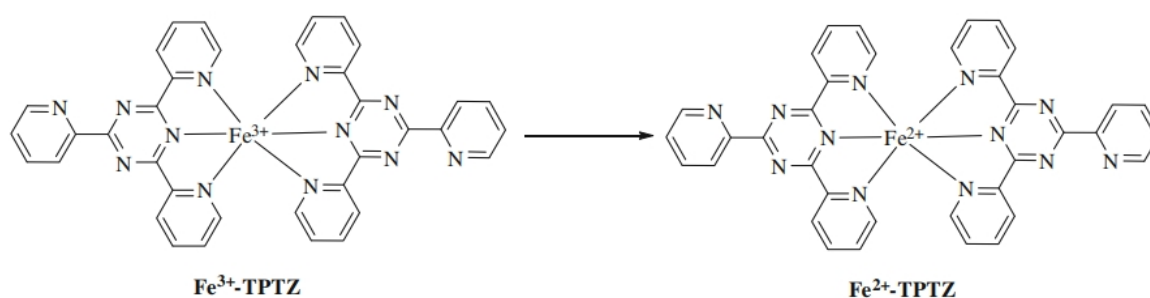
Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva određuje se pomoću jednadžbe:

$$\% \text{ antioksidacijske aktivnosti} = [(A_c - A_s)/A_s] * 100 \quad (3)$$

gdje A_c označava apsorpciju otopine DPPH radikala, a A_s predstavlja apsorpciju istraživanog uzorka. Iako je ova metoda jednostavna i ne zahtjeva neku posebnu pripremu uzorka, osjetljiva je na utjecaj zračenja, prisutnost kisika u zraku, pH vrijednost i vrstu otapala (Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2022). DPPH radikal je uglavnom topljiv u organskim otapalima, ali ne i u vodi, što predstavlja ograničenje metode za određivanje hidrofилnih antioksidansa. Reakciju DPPH radikala i antioksidansa (jednadžba 2) potrebno je provoditi u mraku te se kao otapalo treba koristiti destilirana voda. Kada bi se kao otapalo koristila voda koja je stajala nekoliko dana na zraku, zbog otopljenog CO₂ došlo bi do promjene pH vrijednosti, što bi utjecalo na rezultate i točnost metode (Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2022).

2.5.2. FRAP metoda

FRAP metoda je tipična metoda koja se temelji na SET reakcijama i koristi se za mjerenje sposobnosti antioksidansa da reducira kompleks željezovih Fe^{3+} iona u kompleks Fe^{2+} iona (Slika 8.), koji u kiselim uvjetima ima intenzivno plavu boju (Munteanu i Apetrei, 2021). Metoda je prvobitno bila razvijena za mjerenje koncentracije askorbinske kiseline u krvnoj plazmi, a kasnije se počela koristiti za procjenu sposobnosti tvari da doniraju elektrone (Lang i sur., 2022). Aktivnost antioksidansa se procjenjuje povećanjem apsorbancije pri 593 nm, a rezultati se prikazuju kao ekvivalenti askorbinske kiseline. Za razliku od ostalih metoda temeljenih na SET reakcijama, FRAP metoda se provodi u kiselom pH kako bi se održala topljivost željeza (Munteanu i Apetrei, 2012). Kao ligand na koji se veže željezov ion u kompleksu, koristi se 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ).



Slika 8. Reakcija redukcije u FRAP metodi (Gülcin, 2012).

Svaki spoj koji ima redoks potencijal niži od redoks para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ može teoretski reducirati Fe^{3+} u Fe^{2+} , što može dovesti do lažnih rezultata metode, čak i ako taj spoj nema antioksidativna svojstva. S druge strane, neki antioksidansi ne reduciraju Fe^{3+} dovoljno brzo da bi se njihova aktivnost mogla izmjeriti u uobičajenom vremenskom okviru promatranja (Magalhães i sur., 2008). Polifenoli koji brzo reagiraju vežu se na željezo ili se razgrađuju u spojeve s drugačijom reaktivnošću i najbolje se analiziraju s kratkim vremenima reakcije. Međutim, neki polifenoli reagiraju sporije te su za njihovu detekciju potrebna duža vremena reakcija (Gülcin, 2012). Antioksidacijska aktivnost polifenola određuje se pomoću jednadžbe:

$$\text{FRAP} = \text{AAE} * 2 * \text{razrjeđenje} \quad (4)$$

gdje AAE označava ekvivalente askorbinske kiseline. S obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti 2 elektrona, a za redukciju željeza je potreban samo jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline potrebno je pomnožiti s 2. FRAP metoda je jednostavna i ekonomična te se širom svijeta koristi u različite svrhe.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijali

- samljevna pogača zaostala od prešanja sjemenki boražine (Poljska, berba 2022.)

3.1.2. Kemikalije

- Deionizirana voda
- 96 % -tni etanol (Etanol 96 %, p.a. , Kemika)
- Folin-Ciocalteu reagens (F9252-100 mL, 2N, Sigma-Aldrich)
- mikrofiltrirani natrijev karbonat (Na_2CO_3 , p.a., Kemika)
- DPPH reagens (2,2-Dphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich)
- 37 %-tna klorovodična kiselina (Kemika)
- TPTZ reagens (2,4,6-tripridil-s-triazin, > 98 %, Sigma-Aldrich)
- željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 99 %, Kemika)
- natrijev-acetat trihidrat (99.5 %, Lachner s.r.o.)
- galacijalna octena kiselina (Alkaloid Skoplje)
- askorbinska kiselina (poljo-Evelin d.o.o.)

3.1.3. Aparatura i pribor

- tehnička vaga Kern KB
- mikrovalni reaktor Milestone Start S
- Büchnerov lijevak
- odsisna boca
- Falcon epruveta
- vortex miješalica MS2 minishaker, IKA
- staklene bočice
- UV/VIS Spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25
- kvarcne kivete
- mikrofiltrar chromofil Xtra PTFE
- automatske pipete
- laboratorijske čaše
- vodena kupelj Bandelin sonorex digiplus
- menzura
- odmjerna tikvica

- stakleni lijevak
- magnetni štapić
- špatula
- analitička vaga Mettler Toledo
- filter papir
- boca štrcaljka

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem

Izvaže se 2 g uzorka na tehničkoj vagi na papirnatoy lađici te se izvagani uzorak prebaci u tikvicu s okruglim dnom. Zatim se u tikvicu doda 100 mL odabranog otapala. Kao otapala u eksperimentima koristili su se deionizirana voda, 96 %-tni etanol, 70 %-tna vodena otopina etanola i 30 %-tna vodena otopina etanola. Sadržaj tikvice se izmiješa te se nakon toga doda magnet koji će omogućiti ravnomjerno miješanje uzorka tijekom mikrovalne ekstrakcije. Nakon pripreme, uzorak se stavlja u mikrovalni reaktor (Slika 9.) te se podešavaju vrijeme primjene, snaga i temperatura. Vrijeme primjene postavlja se na 5 minuta, snaga na 400 W, a temperature se mijenjaju tijekom izvođenja eksperimenta. Eksperimenti su provedeni pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C za svako pojedino otapalo. Po isteku vremena od 5 minuta, uzorak se izvadi iz mikrovalnog reaktora te se profiltrira pomoću Büchnerovog lijevka, koji se nalazi na odsisnoj boci spojenoj na vakuum, kako bi se pospješila filtracija. Tako dobiveni filtrat se zatim kvantitativno prenese u Falcon epruvete i skladišti u hladnjaku, kako bi se sačuvao do daljnje analize.



Slika 9. Mikrovalni reaktor
Milestone Start S (vlastita fotografija).

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Filtrat dobiven filtracijom mikrovalnih ekstrakata se prvo izmiješa na vortex miješalici kako bi se homogenizirao. 1 do 2 mL takvog ekstrakta se zatim filtrira preko mikrofiltera u staklenu bočicu te se sadržaj bočice ponovno miješa pomoću vortex miješalice. Prije analiziranja uzoraka na spektrofotometru, za određena otapala potrebno je napraviti razrjeđenja. Uzorke u kojima su kao otapala korišteni deionizirana voda, 70 %-tna vodena otopina etanola i 30 %-tna vodena otopina etanola potrebno je razrijediti 2 puta i zatim ponovno promiješati na vortex miješalici. Kada je kao otapalo u eksperimentu korišten 96 %-tni etanol, razrjeđivanje nije bilo potrebno. Kako bi se mogla napraviti statistička obrada dobivenih rezultata, potrebno je za svako otapalo napraviti tri uzorka, tj. mjeriti tri paralele na spektrofotometru. Da bi to postigli potrebno je otpipetirati 100 μ L prethodno pripremljenih razrjeđenja u 3 nove staklene bočice (Slika 10.), dodati 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL deionizirane vode te pustiti da odstoji 3 minute. Po isteku 3 minute u staklenu bočicu dodaje se i 1 mL prethodno mikrofiltriranog natrijevog karbonata. Sadržaj bočice se još jednom promiješa na vortex miješalici i stavi u vodenu kupelj na 25 minuta pri 50 °C. Kako bi se uspješno provela analiza uzoraka na spektrofotometru, potrebno je pripremiti i slijepu probu. Prilikom izvođenja eksperimenata u staklenu bočicu za slijepu probu otpipetira se 100 μ L određenog otapala, 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL deionizirane vode te se nakon 3 minute doda prethodno mikrofiltrirani natrijev karbonat. Sadržaj bočice se promiješa na vortex miješalici i

stavi sa ostalim uzorcima u vodenu kupelj na 25 minuta pri 50 °C. Po isteku 25 minuta, uzorci se izvade iz vodene kupelji i spremni su za analizu na spektrofotometru. Za provođenje analize na spektrofotometru korištene su kvarcne kivete. U jednu kivetu otpipetira se 2,5 mL slijepa probe, a u ostale 3 se otpipetira 2,5 mL određenog uzorka (određeno otapalo, pri određenoj temperaturi). Nakon svakog mjerenja kivete je potrebno dobro isprati, prvo deioniziranom vodom, a zatim i 96 %-tnim etanolom te pustiti da se u potpunosti osuše kako bi se izbjegla kontaminacija ostalih uzoraka. Na spektrofotometru se mjeri apsorbancija pri 756 nm te se ona prati u odabranom programu. Program koji se koristio prilikom izvođenja ovih eksperimenata bio je Lambda 25.

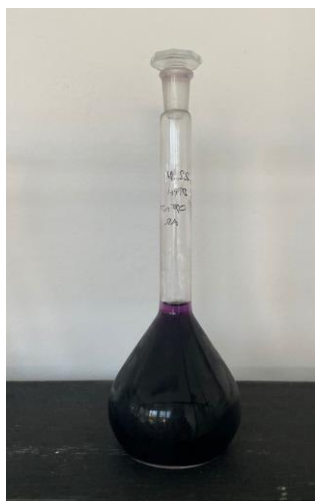


Slika 10. Priprema uzoraka za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (vlastita fotografija).

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost odabranih mikrovalnih ekstrakata biljke *Borago officinalis* L. pomoću DPPH metode, prvo je potrebno pripremiti otopinu DPPH (Slika 11.). Da bi se ta otopina pripremila potrebno je odvagati 6 mg DPPH reagensa (2,2-Dphenyl-1-picrylhydrazyl) na analitičkoj vagi i otopiti ga u odmjernoj tikvici od 100 mL. Kao otapalo se koristi 96 %-tni etanol. Odmjernu tikvicu potrebno je omotati aluminijskom folijom i njen sadržaj izmiješati na vortex miješalici. Prije svakog mjerenja apsorbancije uzoraka na spektrofotometru potrebno je izmjeriti apsorbanciju referentne otopine DPPH. Apsorbancija se

mjeri pri 517 nm. Za pripremu referentne otopine DPPH potrebno je u kivetu otpipetirati 2,5 mL prethodno pripremljene otopine DPPH i 100 μ L 96 %-tnog etanola. Apsorbancija tako pripremljenog uzorka trebala bi biti oko 1,6. Za pripremu slijepe probe u kivete se otpipetira 2,5 mL 96 %-tnog etanola. Za svaki ekstrakt, potrebno je provesti 3 mjerenja, tj. 3 paralele. Mikrovalni ekstrakti se prvo izmiješaju na vortex miješalici kako bi se homogenizirali te se zatim 1 do 2 mL takvog ekstrakta filtrira preko mikrofiltera u staklenu bočicu, čiji se sadržaj ponovno izmiješa na vortex miješalici. Tako pripremljen uzorak se onda koristi za daljnju analizu. Za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru u kivete je potrebno otpipetirati 2,5 mL pripremljene otopine DPPH i 100 μ L odabranog ekstrakta te se kivete zatim stavljaju u tamu na 30 minuta. Po isteku 30 minuta, mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Nakon svakog uzorka potrebno je kivete dobro isprati, prvo deioniziranom vodom, a zatim 96 %-tnim etanolom i pustiti da se u potpunosti osuše, prije provođenja eksperimenata za sljedeći uzorak.



Slika 11. Pripremljena otopina DPPH (vlastita fotografija).

3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Za provođenje eksperimenta FRAP metodom, prvo je potrebno pripremiti FRAP reagens (Slika 12.). FRAP reagens potrebno je pripremiti prije svakog mjerenja. Za pripravu FRAP reagensa potrebno je u Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirati 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL prethodno pripremljenog TPTZ reagensa i 2,5 mL željezovog(III) klorid heksahidrata. Tikvica se zatim stavi u vodenu kupelj na 10 minuta pri 37 °C. Za pripremu TPTZ reagensa odvaži se 0,0312 g TPTZ na lađici na analitičkoj vagi i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te se nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom. Nakon pripremljenih reagensa, pripremaju se uzorci. Mikrovalne ekstrakte potrebno je izmiješati na

vortex miješalici kako bi se homogenizirali, 1 do 2 mL takvog ekstrakta je zatim potrebno filtrirati preko mikrofiltera u staklene bočice, čiji se sadržaj ponovno miješa na vortex miješalici. Tako pripremljene uzorke potrebno je razrijediti. Uzorke u kojima su kao otapala korišteni deionizirana voda, 70 %-tna vodena otopina etanola i 30 %-tna vodena otopina etanola potrebno je razrijediti 25 puta, dok je uzorak u kojem je kao otapalo korišten 96 %-tni etanol potrebno razrijediti 15 puta. U epruvete se zatim otpipetira 300 μ L razrijeđenog uzorka (ekstrakta) i 2,25 mL FRAP reagensa te se epruveta stavi u vodenu kupelj na 10 minuta pri 37 °C. Kao slijepa proba, za ovaj eksperiment, koristi se deionizirana voda. Po isteku 10 minuta, za svaki određeni uzorak, cijeli sadržaj epruvete se kvantitativno prenese u kivetu te se apsorbancija u spektrofotometru mjeri pri valnoj duljini od 593 nm.

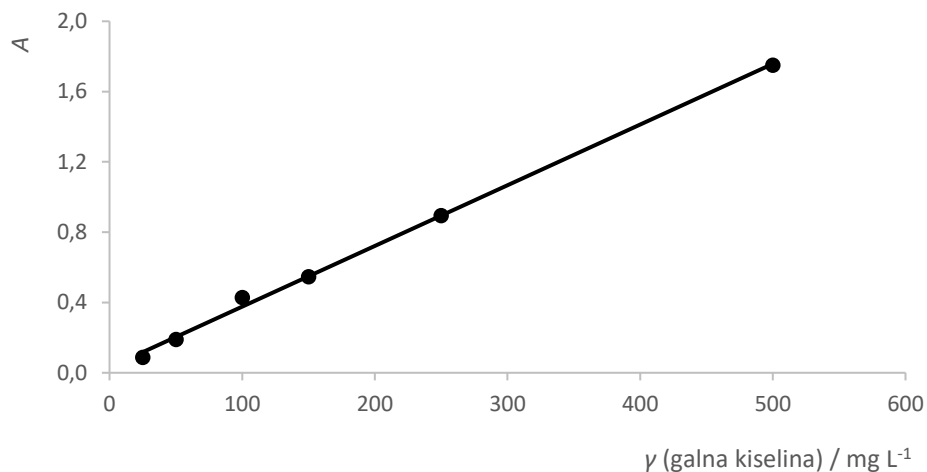


Slika 12. FRAP reagens (vlastita fotografija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je određivanje antioksidacijske aktivnosti i masene koncentracije ukupnih fenola mikrovalnih ekstrakata biljke *Borago officinalis* L. Eksperiment je započet s izradom baždarnog dijagrama kako bi se mogla odrediti koncentracija ukupnih fenola. Ostatak eksperimenta sastoji se od određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka pomoću DPPH i FRAP metoda.

Za izradu baždarnog dijagrama spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija šest otopina galne kiseline poznatih koncentracija. Baždarni dijagram prikazuje ovisnost apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline u analiziranim otopinama (Slika 13.).



Slika 13. Baždarni dijagram galne kiseline.

Jednadžba dobivenog pravca baždarnog dijagrama glasi:

$$y = 0,003454x + 0,030969 \quad (5)$$

Određivanje masene koncentracije ukupnih fenola mikrovalnih ekstrakata biljke *Borago officinalis* L. provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Korištena su 4 različita otapala pri 3 različite temperature te je za svaki uzorak mjerenje ponovljeno 3 puta. Srednja vrijednost triju vrijednosti apsorbancije pri 765 nm, za svaki uzorak, uvrštena je u jednadžbu pravca baždarnog dijagrama (jednadžba 5). Jednadžba pravca je preuređena i prikazana eksplicitno. Eksplicitna jednadžba za računanje masene koncentracije ukupnih fenola kao ekvivalenata galne kiseline (mg GAE L⁻¹) u uzorcima dana je sljedećom jednadžbom:

$$\text{mg GAE L}^{-1} = \frac{A_{765 \text{ nm}} - 0,030969}{0,003454} * \text{razrjeđenje} \quad (6)$$

Izravnim korištenjem eksplicitnog oblika jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (jednadžba 6) izračunate su masene koncentracije ukupnih fenola u analiziranim uzorcima mikrovalnih ekstrakata kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE L⁻¹).

Tablica 1. Masene koncentracije ukupnih fenola u uzorcima gdje je kao otapalo korištena deionizirana voda.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{765\text{ nm}}$	$\overline{A_{765\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	mg GAE L ⁻¹	$\overline{\text{mg GAE L}^{-1}} \pm \text{sd}$
40	0,3781	0,3167 ± 0,0838	201,0	165,4 ± 48,5
	0,3508		185,2	
	0,2212		110,1	
60	0,3144	0,3038 ± 0,0260	164,1	158,0 ± 15,1
	0,3229		169,0	
	0,2741		140,8	
80	0,4491	0,4774 ± 0,0308	242,1	258,5 ± 17,8
	0,4730		256,0	
	0,5102		277,5	

Kada je kao otapalo u eksperimentu korištena deionizirana voda (Tablica 1.), može se primijetiti da najvišu masenu koncentraciju ukupnih polifenola sadrži uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri temperaturi od 80 °C. Također, može se primijetiti da porastom temperature mikrovalne ekstrakcije, raste masena koncentracija ukupnih fenola.

Tablica 2. Masene koncentracije ukupnih fenola u uzorcima gdje je kao otapalo korištena 30 %-tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{765\text{ nm}}$	$\overline{A_{765\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	mg GAE L ⁻¹	$\overline{\text{mg GAE L}^{-1}} \pm \text{sd}$
40	0,2945	0,2878 ± 0,0090	152,6	148,7 ± 5,2
	0,2914		150,8	
	0,2776		142,8	
60	0,5201	0,5956 ± 0,0763	283,2	327,0 ± 44,2
	0,5941		326,1	
	0,6727		371,6	
80	0,4323	0,4311 ± 0,0272	232,4	231,7 ± 15,7
	0,4034		215,6	
	0,4578		247,1	

Međutim, kada je kao otapalo u uzorku korištena 30 %-tna vodena otopina etanola (Tablica 2.), rezultati su nešto drugačiji u odnosu na prijašnje (Tablica 1.). Naime, iz rezultata se sada može iščitati da najvišu masenu koncentraciju ukupnih polifenola ipak ima uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C, dok se onaj uzorak kod kojeg se ekstrakcija

provodila pri 80 °C nalazi na 2. mjestu. Moguće je povući paralelu te primijetiti da u oba slučaja, i kada je kao otapalo korištena deionizirana voda i kada je korištena 30 %-tna vodena otopina etanola, najnižu masenu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 40 °C.

Tablica 3. Masene koncentracije ukupnih fenola u uzorcima gdje je kao otapalo korištena 70 %-tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{765\text{ nm}}$	$\overline{A_{765\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	mg GAE L ⁻¹	$\overline{\text{mg GAE L}^{-1}} \pm \text{sd}$
40	0,2403	0,2421 ± 0,0198	121,2	122,3 ± 11,4
	0,2234		111,4	
	0,2627		134,2	
60	0,3804	0,4086 ± 0,0501	202,3	218,6 ± 29,0
	0,3789		201,5	
	0,4664		252,11	
80	0,8427	0,6999 ± 0,1237	470,0	387,4 ± 71,6
	0,6336		348,9	
	0,6236		343,2	

Kao treće otapalo u eksperimentu korištena je 70 % -tna vodena otopina etanola, gdje se iz rezultata (Tablica 3.) može iščitati da najnižu masenu koncentraciju ukupnih fenola opet pokazuje uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C, dok najvišu pokazuje onaj kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 80 °C, što je bio slučaj i kada je kao otapalo korištena deionizirana voda (Tablica 1.). Međutim, ovaj uzorak (Tablica 3.) ipak pokazuje najvišu određenu masenu koncentraciju ukupnih fenola u provedenom eksperimentu.

Tablica 4. Masene koncentracije ukupnih fenola u uzorcima gdje je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{765\text{ nm}}$	$\overline{A_{765\text{ nm}}}\pm\text{sd}$	mg GAE L ⁻¹	$\overline{\text{mg GAE L}^{-1}}\pm\text{sd}$
40	0,2827	0,2355 ± 0,0577	72,9	59,2 ± 16,7
	0,2525		64,1	
	0,1712		40,6	
60	0,3272	0,3313 ± 0,0103	85,8	87,0 ± 3,0
	0,3430		90,4	
	0,3237		84,8	
80	0,3591	0,3857 ± 0,0237	95,0	102,7 ± 6,9
	0,4045		108,1	
	0,3936		105,0	

Uzorci u kojima je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol (Tablica 4.) pokazuju daleko niže masene koncentracije ukupnih fenola od ostalih uzoraka. Treba se primijetiti da najnižu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je metoda mikrovalne ekstrakcije provedena pri 40 °C, a najvišu pak onaj kod kojeg se ekstrakcija provodila pri 80 °C. Nakon provedenog eksperimenta i obrađenih rezultata, ispostavlja se da od svih 12 istraživanih uzoraka najvišu masenu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola, a mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 80 °C. Najnižu masenu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol, a mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 40 °C.

Antioksidacijska aktivnost pripremljenih uzoraka određivana je pomoću DPPH metode. Rezultati prikazani u tablicama izračunati su uz pomoć jednadžbe za antioksidacijsku aktivnost DPPH metode (jednadžba 3). Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom izražava se kao % inhibicije DPPH radikala. Za očekivati je da će uzorci sa višom masenom koncentracijom ukupnih fenola pokazivati višu antioksidacijsku aktivnost.

Tablica 5. Antioksidacijska aktivnost uzoraka, određena DPPH metodom, gdje je kao otapalo korištena deionizirana voda.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{517\text{ nm}}$	$\overline{A_{517\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	% inhibicije	$\overline{\% \text{ inhibicije}} \pm \text{sd}$
40	0,2824	0,2823 \pm 0,0034	82,7	82,7 % \pm 0,2
	0,2857		82,5	
	0,2788		82,9	
60	0,3024	0,2975 \pm 0,0048	81,4	81,6 % \pm 0,3
	0,2974		81,7	
	0,2927		82,0	
80	0,3851	0,3828 \pm 0,0075	76,3	76,6 % \pm 0,4
	0,3743		77,0	
	0,3832		76,5	

Iz podataka u tablici, za uzorke u kojima je kao otapalo korištena deionizirana voda (Tablica 5.), vidljivo je da najveći postotak inhibicije pokazuje uzorak u kojem se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C, što odstupa od pretpostavke da će najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazivati uzorci s najvišom masenom koncentracijom ukupnih fenola (Tablica 1.). Uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C također pokazuje vrlo visoki stupanj inhibicije, dok posljednji uzorak pokazuje najniži stupanj inhibicije.

Tablica 6. Antioksidacijska aktivnost uzoraka, određena DPPH metodom, gdje je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{517\text{ nm}}$	$\overline{A_{517\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	% inhibicije	$\overline{\% \text{ inhibicije}} \pm \text{sd}$
40	0,2969	0,2894 \pm 0,0074	81,8	82,2 % \pm 0,5
	0,2893		82,2	
	0,2821		82,7	
60	0,2863	0,2996 \pm 0,0115	83,3	82,5 % \pm 0,7
	0,3063		82,2	
	0,3062		82,2	
80	0,3374	0,3299 \pm 0,0088	80,3	80,8 % \pm 0,5
	0,3323		80,6	
	0,3202		80,3	

Rezultati uzoraka, u kojima je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola (Tablica 6.), prikazuju da najveći stupanj inhibicije pokazuje uzorak kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija

provođena pri 60 °C, što je u skladu sa pretpostavkom da viša masena koncentracija ukupnih fenola ukazuje i na više antioksidacijsko djelovanje. Sva tri uzorka pokazuju dosta visoki stupanj inhibicije.

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost uzoraka, određena DPPH metodom, gdje je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{517\text{ nm}}$	$\overline{A_{517\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	% inhibicije	$\overline{\% \text{ inhibicije}} \pm \text{sd}$
40	0,2558	$0,2544 \pm 0,0022$	85,1	85,2 % \pm 0,1
	0,2519		85,3	
	0,2554		85,1	
60	0,2204	$0,2198 \pm 0,0016$	87,2	87,2 % \pm 0,1
	0,2210		87,1	
	0,2179		87,3	
80	0,2206	$0,2195 \pm 0,0021$	87,1	87,2 % \pm 0,1
	0,2170		87,4	
	0,2208		87,1	

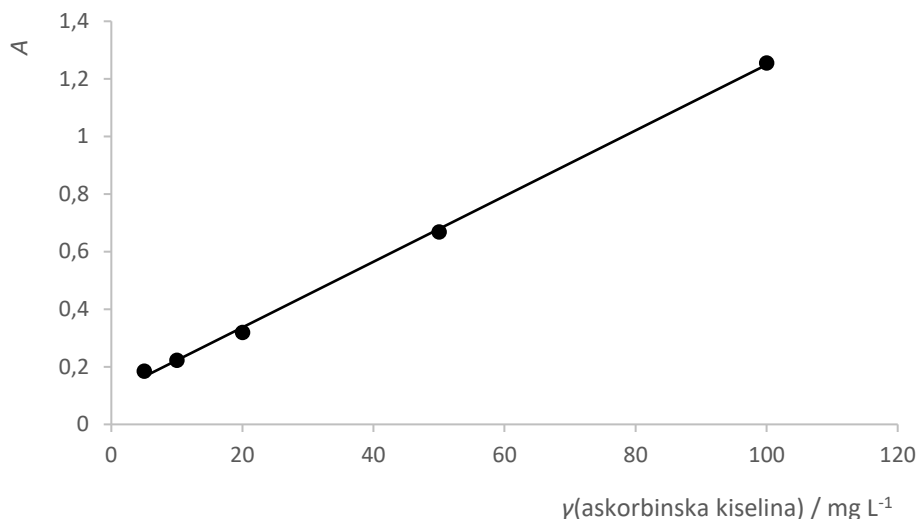
Kada je kao otapalo u uzorcima korištena 70 % -tna vodena otopina etanola (Tablica 7.) primjećuje se znatan skok stupnja inhibicije uzoraka u odnosu na ostale uzorke u kojima su korištena druga otapala. Najviši stupanj inhibicije pokazuju uzorci u kojima je mikrovalna ekstrakcija provođena pri 60 °C i pri 80 °C. Za uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C bilo je i za očekivati da će pokazivati najvišu antioksidacijsku aktivnost s obzirom da posjeduje najvišu masenu koncentraciju ukupnih fenola. Međutim, uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C pokazuje jednako visoki stupanj inhibicije, iako je masena koncentracija ukupnih fenola bila niža za skoro 170 mg GAE L⁻¹ od onog kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C. Kao što je bilo za očekivati, uzorak kod kojeg se ekstrakcija provodila pri 40 °C pokazuje najniži stupanj inhibicije.

Tablica 8. Antioksidacijska aktivnost uzoraka, određena DPPH metodom, gdje je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{517\text{ nm}}$	$\overline{A_{517\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	% inhibicije	% inhibicije \pm sd
40	1,0064	1,0429 \pm 0,0410	41,3	39,2 % \pm 2,4
	1,0873		36,6	
	1,0351		39,7	
60	1,1700	1,1990 \pm 0,0699	36,8	35,2 % \pm 3,8
	1,2787		30,9	
	1,1484		38,0	
80	1,3383	1,3000 \pm 0,0357	27,7	29,8 % \pm 1,9
	1,2677		31,5	
	1,2942		30,1	

Od uzoraka u kojima je kao otapalo korišten 96 %-tni etanol (Tablica 8.), najviši stupanj inhibicije pokazuje uzorak kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 40 °C, što opet odstupa od pretpostavke da su antioksidacijska aktivnost i masena koncentracija ukupnih fenola međusobno ovisne veličine. Od svih uzoraka, čija je antioksidacijska aktivnost ispitana DPPH metodom, uzorci kod kojih je kao otapalo korišten 96 %-tni etanol pokazuju najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, kao što je i očekivano.

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je i FRAP metodom. Za provedbu eksperimenta prvo je potrebno izraditi baždarni dijagram kako bi se rezultati mogli prikazati i očitati. Za izradu baždarnog dijagrama spektrofotometrijski je određena apsorbancija 5 otopina askorbinske kiseline poznatih masenih koncentracija, kojima je dodan i FRAP reagens. Baždarni dijagram prikazuje ovisnost apsorbancije prvi valnoj duljini od 593 nm, na kojoj je zabilježen maksimum apsorbancije, o masenoj koncentraciji askorbinske kiseline u analiziranim otopinama (Slika 14.).



Slika 14. Baždarni dijagram askorbinske kiseline.

Jednadžba dobivenog pravca baždarnog dijagrama za FRAP metodu glasi:

$$y = 0,0114x + 1,087 \quad (7)$$

gdje y predstavlja apsorbanciju pri 593 nm, a x predstavlja ekvivalente askorbinske kiseline (AAE). Antioksidacijska aktivnost uzoraka se izračunava pomoću jednadžbe pravca (jednadžba 7) i jednadžbe za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom (jednadžba 4).

Tablica 9. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena FRAP metodom, gdje je kao otapalo korištena deionizirana voda.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{593 \text{ nm}}$	$\overline{A_{593 \text{ nm}}} \pm \text{sd}$	FRAP	$\overline{\text{FRAP}} \pm \text{sd}$
40	0,8389	$0,8756 \pm 0,0470$	3201,9	$3362,9 \pm 206,1$
	0,8594		3291,6	
	0,9286		3595,1	
60	0,7124	$0,7445 \pm 0,0291$	2647,2	$2787,9 \pm 127,6$
	0,7519		2820,4	
	0,7692		2896,2	
80	0,8052	$0,8354 \pm 0,0316$	3054,1	$3186,3 \pm 138,8$
	0,8325		3173,9	
	0,8683		3330,8	

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, postavlja se ista pretpostavka kao i za DPPH metodu – da su masena koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost

ovisne veličine. U uzorcima u kojim je kao otapalo korištena deionizirana voda (Tablica 9.) ta pretpostavka ne vrijedi te najvišu antioksidacijsku aktivnost, kao i kod DPPH metode, pokazuje upravo onaj uzorak koji pokazuje najnižu masenu koncentraciju ukupnih fenola, a to je onaj uzorak kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 40 °C.

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena FRAP metodom, gdje je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{593\text{ nm}}$	$\overline{A_{593\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	FRAP	$\overline{\text{FRAP}} \pm \text{sd}$
40	0,7604	$0,7572 \pm 0,0095$	2857,3	$2843,4 \pm 41,8$
	0,7465		2796,4	
	0,7648		2876,5	
60	0,7084	$0,7555 \pm 0,0446$	3058,7	$3265,1 \pm 195,7$
	0,7609		3288,7	
	0,7972		3448,0	
80	0,9025	$0,8984 \pm 0,0113$	3480,6	$3462,7 \pm 49,3$
	0,9070		3500,5	
	0,8857		3406,9	

Što se tiče uzoraka kod kojih je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola, rezultati ponovno nisu u skladu sa pretpostavkom. Iako najvišu masenu koncentraciju ukupnih fenola pokazuje uzorak kod kojeg je mikrovalna ekstrakcija provedena pri 60 °C (Tablica 2.), prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom rezultati pokazuju da najvišu antioksidacijsku aktivnost ipak pokazuje uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C, što također odstupa i od rezultata za antioksidacijsku aktivnost određivanu DPPH metodom (Tablica 6.)

Tablica 11. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena FRAP metodom, gdje je kao otapalo korištena 70 %- tna vodena otopina etanola.

$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{593\text{ nm}}$	$\overline{A_{593\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	FRAP	$\overline{\text{FRAP}} \pm \text{sd}$
40	0,6415	0,6629 \pm 0,0189	2336,3	2429,9 \pm 82,7
	0,6697		2460,0	
	0,6773		2493,4	
60	0,7781	0,8046 \pm 0,0245	2935,2	3051,4 \pm 107,3
	0,8094		3072,4	
	0,8263		3146,7	
80	0,8441	0,8688 \pm 0,0224	3224,6	3333,1 \pm 98,0
	0,8876		3415,3	
	0,8748		3359,3	

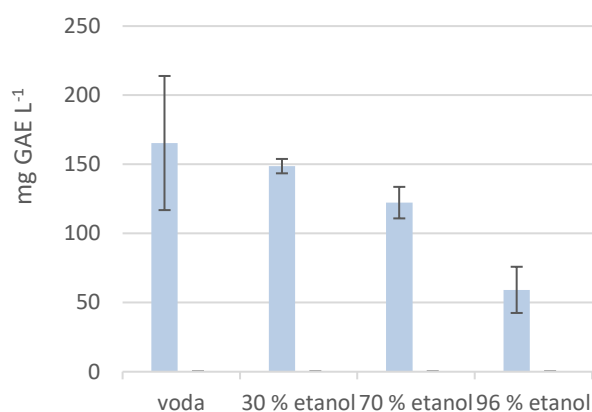
Od uzoraka kod kojih je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola, najvišu antioksidacijsku aktivnost, određenu FRAP metodom, pokazuje uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C. To je ujedno i uzorak koji pokazuje najvišu masenu koncentraciju ukupnih fenola (Tablica 3.) te najvišu antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom (Tablica 7.). Iako je prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom dobiveno da uzorci kod kojih se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C i 80 °C pokazuju jednaku antioksidacijsku aktivnost (Tablica 7.), kada je antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom to nije bio slučaj.

Tablica 12. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena FRAP metodom, gdje je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol.

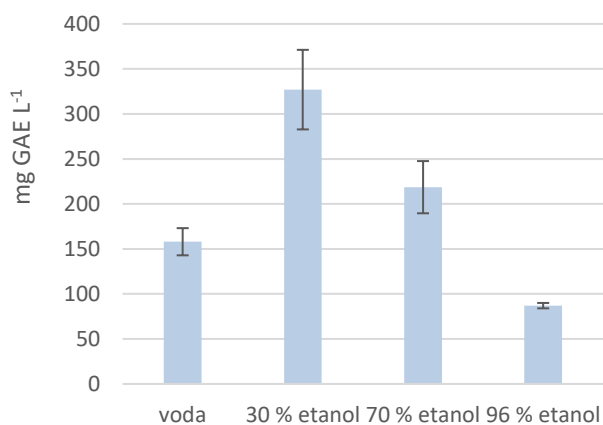
$\theta/^\circ\text{C}$	$A_{593\text{ nm}}$	$\overline{A_{593\text{ nm}}} \pm \text{sd}$	FRAP	$\overline{\text{FRAP}} \pm \text{sd}$
40	0,768060	0,7928 ± 0,0223	1734,7	1799,8 ± 58,7
	0,798960		1816,0	
	0,811350		1848,6	
60	0,718400	0,7317 ± 0,0145	1604,1	1639,2 ± 38,3
	0,729560		1633,4	
	0,747250		1680,0	
80	0,713740	0,7349 ± 0,0324	1591,8	1647,0 ± 85,2
	0,718680		1604,8	
	0,772170		1745,5	

Kao posljednje otapalo u eksperimentu korišten je 96 % -tni etanol. Rezultati tih uzoraka (Tablica 12.) pokazuju da najvišu antioksidacijsku aktivnost posjeduje uzorak kod kojeg se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C, što opet odstupa od pretpostavke, ali rezultati su u jednakom odnosu kao i oni kada se antioksidacijska aktivnost određivala DPPH metodom (Tablica 8.). Iako je očekivano da će najvišu antioksidacijsku aktivnost, određenu FRAP metodom, pokazivati uzorak gdje je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola, ekperimentalno se ispostavilo da najvišu antioksidacijsku aktivnost ipak pokazuje uzorak u kojem je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola te se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C. Najnižu antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol, a mikrovalna ekstrakcija se provodila pri 60 °C.

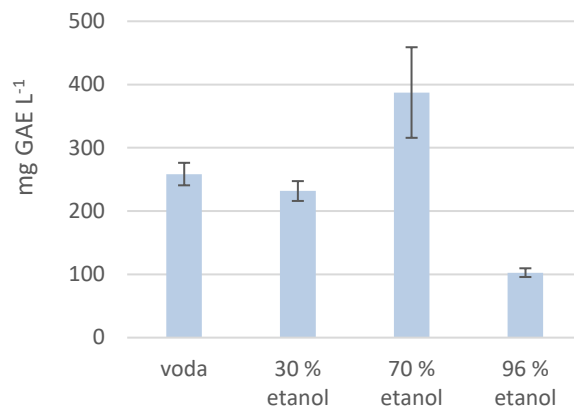
Radi preglednosti i lakše usporedbe, rezultati određivanja masene koncentracije ukupnih fenola prikazani su i grafički (Slika 15. – Slika 17).



Slika 15. Grafički prikaz masenih koncentracija ukupnih fenola, koji su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE L⁻¹), za sva 4 korištena otapala, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C.

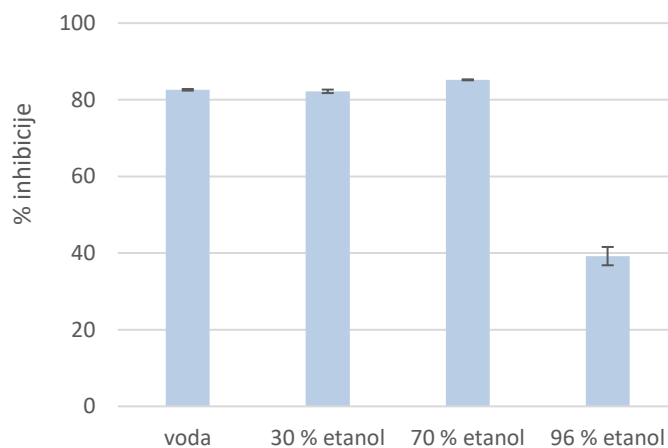


Slika 16. Grafički prikaz masenih koncentracija ukupnih fenola, koji su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE L⁻¹), za sva 4 korištena otapala, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C.

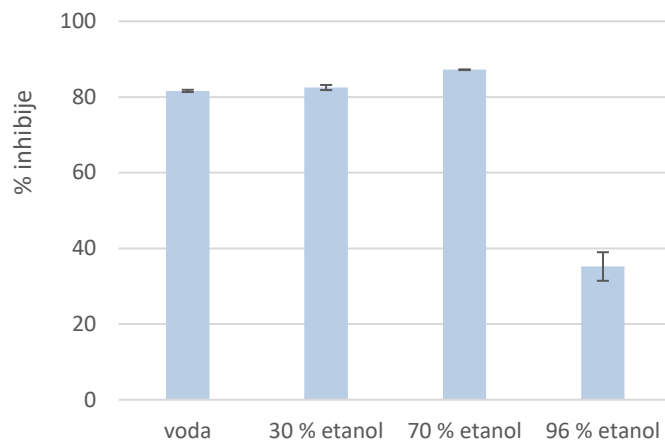


Slika 17. Grafički prikaz masenih koncentracija ukupnih fenola, koji su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE L⁻¹), za sva 4 korištena otapala, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C.

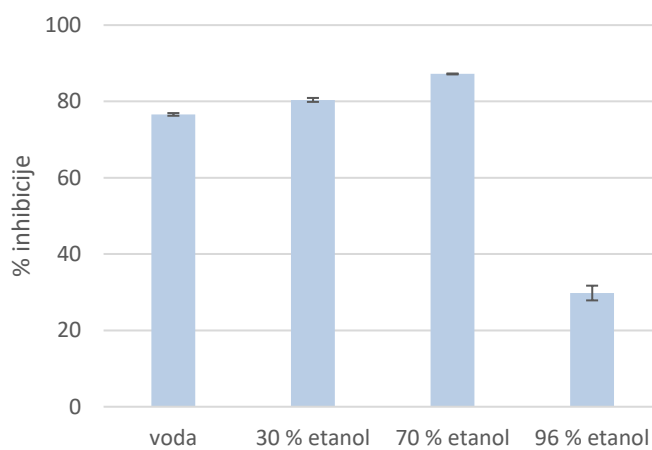
Rezultati antioksidacijske aktivnosti, određivane DPPH metodom, također su prikazani grafički (Slika 18. - Slika 20.) radi bolje preglednosti i lakše usporedbe dobivenih rezultata.



Slika 18. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti uzoraka za DPPH metodu, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C.

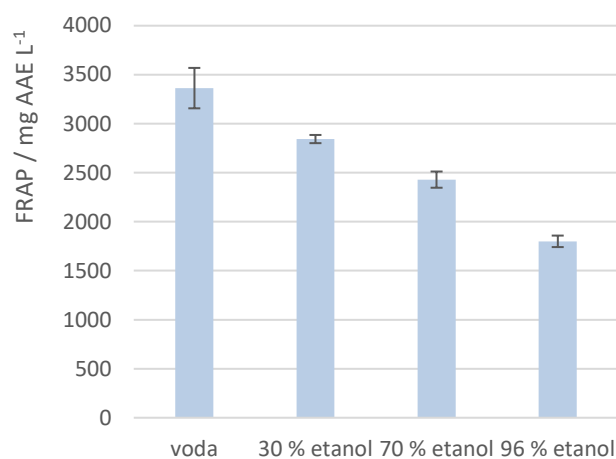


Slika 19. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti uzoraka za DPPH metodu, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C.

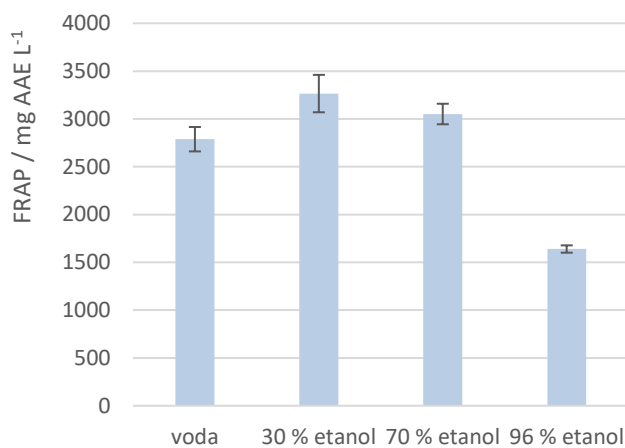


Slika 20. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti za DPPH metodu, kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C.

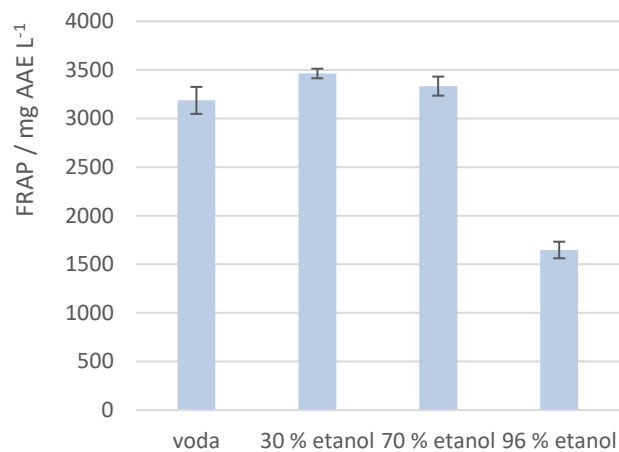
Rezultati antioksidacijske aktivnosti određivane FRAP metodom također su prikazani grafički (Slika 21.-Slika 23.)



Slika 21. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti uzoraka za FRAP metodu, koji su izraženi kao ekvivalenti askorbinske kiseline (mg AAE L⁻¹), kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 40 °C.



Slika 22. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti uzoraka za FRAP metodu, koji su izraženi kao ekvivalenti askorbinske kiseline (mg AAE L⁻¹), kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 60 °C.



Slika 23. Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti uzoraka za FRAP metodu, koji su izraženi kao ekvivalenti askorbinske kiseline (mg AAE L⁻¹), kada se mikrovalna ekstrakcija provodila pri 80 °C.

5. ZAKLJUČCI

U ovome radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost i masena koncentracija ukupnih fenola u mikrovalnim ekstraktima boražine. Nakon provedenog eksperimenta i obrađenih rezultata moguće je zaključiti:

1. Pri određivanju masene koncentracije ukupnih fenola, najvišu vrijednost pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola i mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 80 °C, dok najnižu vrijednost pokazuje uzorak gdje je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol, a mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 40 °C.
2. Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH metodom, najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korištena 70 % -tna vodena otopina etanola, ali što se temperature tiče vrijednosti su iste kada se mikrovalna ekstrakcija provodila i pri 60 °C i pri 80 °C.
3. Najvišu antioksidacijsku aktivnost, određenu FRAP metodom, pokazuje uzorak kod kojeg je kao otapalo korištena 30 % -tna vodena otopina etanola, a mikrovalna ekstrakcija je provedena pri 80 °C.
4. Uzorci u kojima je kao otapalo korišten 96 % -tni etanol pokazuju najniže masene koncentracije ukupnih fenola te najniže vrijednosti antioksidativne aktivnosti.

6. POPIS LITERATURE

Anonymous 1 (2009) Listovi i cvijeće boražine <<https://www.everand.com/book/230386503/Culinary-Herbs-and-Spices-of-the-World>>, Pristupljeno: 5. svibnja 2024.

Amorati, R., Valgimigli, L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants, Informa UK, Ltd. doi:10.3109/10715762-2014.996146.

Blekić, M., Režek – Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J of Food Sci Tehnol* **3** (1), 32 – 47.

Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., Sarker, S. D. (2012) Natural Products Isolation. Microwave Assisted Extraction in Natural Products Isolation, Springer Science + Business Media, str. 90 - 98.

Gülcin, I. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* **86**, 345-391. doi:10.1007/s00204-011-0774-2.

Gülcin, I., Alwasel, S.H. (2023) DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* **11**, 2248. doi: 10.3390/pr11082248.

Hofmann, A. (2010) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Spectroscopic Techniques, Cambridge University Press, Cambridge, str. 479 – 485.

Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Lin, Y., Yang, S., i sur. (2022) Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *J Fut Food* **4** (3), 193 – 204.

Mabberley, D.J. (2008) Mabberley's plant book, 3.izd., Cambridge University Press, Cambridge.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, Elsevier B. V., str. 14 – 16.

Mhamdi, B., Wannes, W. A., Dhiffi, W., Marzouk, B. (2009) Volatiles from leaves and flowers of borage (*Borago officinalis* L.). *J Essent Oil Res* **21**, 504 – 506.

Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22** (7), 3380. doi: 10.3390/ijms22073380.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. (2001) Introduction to spectroscopy, 3.izd., Western Washington University, Bellingham, Washington, str. 353 – 359.

Sadowska – Bartosz, I., Bartosz, G. (2022) Evaluation of The Antioxidant Capacity of food Products: Methods, Applications and Limitations. *Processes* **10** (10), 2031. doi: 10.3390/pr10102031.

Zrinski, I., Ekcert – Maksić, M. (2005) Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi. *Kemija u industriji* **54**, 469-476.

Izjava o izvornosti

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

Anja Rašić

Vlastoručni potpis