

Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva bobica i lista tršlje

Cestar, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:713700>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Nutricionizam

Mateja Cestar

7147/N

Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva bobica i lista tršlje

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva bobica i lista tršlje

Mateja Cestar, 0058207388

Sažetak: Tršlja je mediteranska biljka ljekovitih i terapijskih svojstava, najpoznatija po proizvodnji prirodne smole koja se naziva mastika. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj lokacije rasta (Hvar, Lun, Korčula i Barbariga) na koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti listova i bobica tršlje. Ukupni fenolni spojevi iz etanolnih ekstrakata listova i bobica tršlje, određeni su spektrofotometrijski po Folin-Ciocalteu metodi, a antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom. Koncentracija ukupnih fenola u listovima bila je 3 do 7 puta veća nego u bobicama. Najveće vrijednosti ukupnih fenola sadrže ekstrakti tršlje ubrane na području Hvara. Utvrđena je pozitivna linearna korelacija između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti za listove i za bobice, što upućuje na zaključak da su upravo fenolni spojevi primarno odgovorni za antioksidacijsku aktivnost tršlje.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, fenolni spojevi, FRAP metoda, tršlja (*Pistacia lentiscus* L.)

Rad sadrži: 30 stranica, 17 slika, 3 tablice, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić*

Rad predan: srpanj 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Antioxidant activity of phenolic compounds of berries and leaves of mastic tree

Mateja Cestar, 0058207388

Abstract: Mastic tree is a Mediterranean plant which has medical and therapeutic properties. Furthermore, it is most known for making natural resin which is named mastic. The aim of this research was to determine the influence of harvest location (Hvar, Lun, Korčula and Barbariga) on the concentration of the total phenolic content and antioxidant activity of leaves and berries. Total phenolic content from ethanol extract of leaves and berries are determined spectrophotometrically with Folin-Ciocalteu method, while antioxidant activity is determined by FRAP method. Concentration of total phenolic content in leaves was 3 to 7 times higher than in berries. The highest values of phenolic compounds are found in extracts of plant harvested on Hvar. Positive linear correlation was determined between total phenolic content and antioxidant activity for leaves, as well as for berries which leads to the conclusion that phenolic compounds are primarily responsible for antioxidant activity of mastic tree.

Keywords: antioxidant activity, FRAP method, phenolic compounds, mastic tree (*Pistacia lentiscus L.*)

Thesis contains: 30 pages, 17 figures, 3 tables, 39 references

Original in: Croatian

Final work printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Ivona Elez Garofulić, Assistant Professor*

Thesis delivered: July, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TRŠLJA (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	2
2.1. KEMIJSKI SASTAV TRŠLJE	4
2.2. FENOLNI SPOJEVI TRŠLJE	5
2.2.1. Fenolne kiseline.....	5
2.2.2. Flavonoidi	6
2.2.3. Tanini.....	7
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE	8
2.3.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Uzorci tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	12
3.1.2. Kemikalije i standardi	12
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva tršlje.....	15
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	15
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. UTJECAJ LOKACIJE NA KOLIČINU UKUPNIH FENOLA	21
4.2. UTJECAJ LOKACIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST	22
4.3. KORELACIJA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI LIŠĆA I BOBICA TRŠLJE.....	24
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je biljka u obliku zimzelenog grma ili malog stabla koja raste do visine 1 do 8 m te ima dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini još od drevnih Grka (Benhammou i sur., 2008). Poznata je po proizvodnji prirodne smole zvane mastika, karakteristične arome, zajedno s eteričnim uljem dobivenim iz cvjetova, lišća i grančica (Bampouli i sur., 2015). Bobice se mogu konzumirati sirove ili pržene, dok njihovo ulje ima raznovrsnu medicinsku uporabu u liječenju čireva i psorijaze (Mehenni i sur., 2016).

Poznato je da su farmakološka svojstva narodnih lijekova baziranih na biljnim ekstraktima često povezana s prisutnošću antioksidacijskih fenolnih spojeva (Gonçalves i sur., 2013). Dijelovi biljke sadrže razne medicinski važne kemijske sastojke kao što su smola, eterično ulje, galna kiselina, antocijanini i flavonol glikozidi te α -tokoferol. Ima antioksidativno, antifungalno, antibakterijsko, antimutagensko i antikancerogeno djelovanje te djeluje na zacjeljivanje rana, sniženje lipida i kao lijek kod hipertenzije (Nahida i sur., 2012).

Tršlja ima veliku prehrambenu i industrijsku važnost, osobito u farmaceutskoj industriji, a trenutni interes za zdravstveno djelovanje biljke potaknuo je razvoj novih istraživanja koja koriste postupke ekstrakcije frakcija fenolnih spojeva. Tijekom prošlog desetljeća krenula je sve veća primjena različitih novih metoda ekstrakcije, za koje je dokazano da poboljšavaju efikasnost i kvalitetu ekstrakata, a smanjuju vrijeme ekstrakcije i potrošnju otapala. Metode koje se koriste jesu mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima te ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (Dahmoune i sur., 2014).

Stoga je svrha ovog rada ispitati utjecaj lokacije rasta na koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti listova i bobica tršlje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRŠLJA (*Pistacia lentiscus* L.)

Tršlja, *Pistacia lentiscus* L. pripada carstvu *Plantae*, koljenu *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Sapindales*, porodici *Anacardiaceae*, rodu *Pistacia* (Nahida i sur., 2012).

Tršlja je dvodomna zimzelena biljna vrsta roda pistacija koja raste u obliku grma ili niskog drveća (Tolić, 2003). Uglavnom se pojavljuje u "ekstremnim" ekosustavima mediteranskih zemalja te ima veliku geografsku i bioklimatsku distribuciju koja se proteže od vlažnih do suhih područja (Dahmoune i sur., 2014). U Hrvatskoj raste na otocima i priobalju te je sastavni dio mediteranske makije. Dobro podnosi sušu, visoke temperature i posolicu, što joj omogućuje dobro razvijen korjenov sustav. Lišće je zimzeleno, parno perasto. Ima 3-5 pari tamnozeleno obojenih, jajoliko-lancetastih kožastih listića. Cvjetovi su dvodomni, raspoređeni u gustim cvatovima, tamnocrvenih boja te cvjetaju od ožujka do svibnja. Plod je sitan (2-3 mm), u obliku spljoštene okrugle koštunice. U početku je crvene boje, a kasnije pocrni. Kora je zeleno-siva, u početku glatka, a kasnije potamni pa ispuca u sitne ljuskice. Iz ozlijeđene kore curi mirišljav smolasti sok – mastika (Tolić, 2003).



Slika 1. *Pistacia lentiscus* (Anonymous 1)

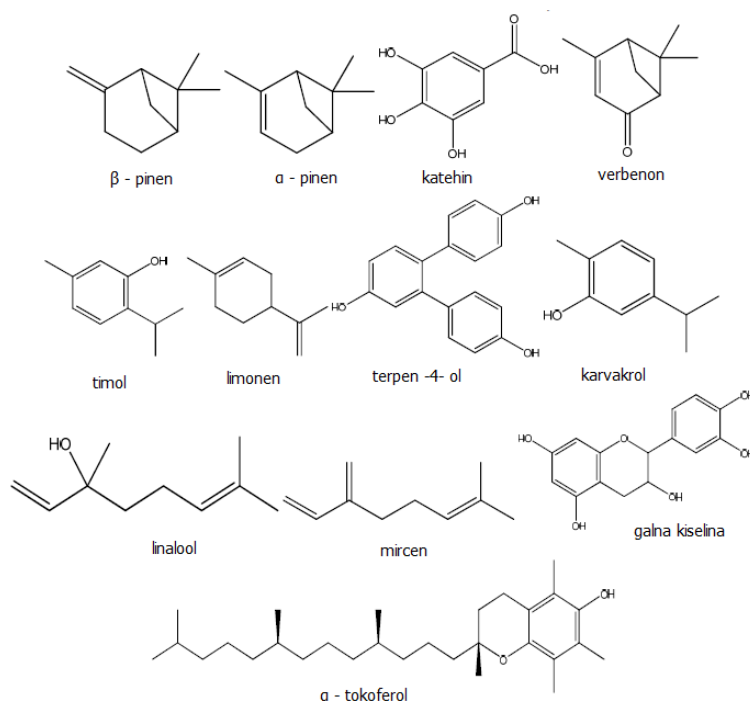
Zbog blagotvorne smole, sama biljka je obično zvana mastika ili mastagi, a primjenjivala se još od davnih vremena u tradicionalnom sustavu liječenja bolesti kao što su ekcemi, oralne infekcije, proljevi, bubrežna litijaza, žutica, glavobolja, ulkus, bol u trbuhu, astma te problemi s disanjem (Cherbal i sur., 2012). Pored njezinih terapijskih učinaka, tršljini dijelovi se također koriste u prehrambenoj industriji. Primjerice, eterična ulja dobivena iz nadzemnih dijelova biljke koriste se kao sredstva za forimiranje arome alkoholnih pića i žvakaća guma. Štoviše, antocijani ekstrahirani iz bobica iskorištavaju se kao bojila za hranu, a ulje bogato mononezasićenim i omega-3 masnim kiselinama (kao što su oleinska kiselina i linolenska kiselina), velike količine fitosterola (kao što je β - sitosterol) i vitamina mogu potencijalno biti uključeni u životinjskoj i ljudskoj prehrani kao izvor antioksidansa (Mehenni i sur., 2016).



Slika 2. Mastika (Anonymous 2)

2.1. KEMIJSKI SASTAV TRŠLJE

Tršlja je bogat izvor eteričnih ulja, masnih kiselina (oleinska, palmitinska i linolenska kiselina) te polifenola (Dahmoune i sur., 2014). Najvrijednija komponenta biljke je smola koja sadrži α -pinen, β -pinen, limonen, terpen-4-ol i terpineol. Esencijalno ulje dobiveno od lišća bogato je β -kariofilenom, germakrenom i γ -kadinenom. Također, listovi su bogat izvor polifenolnih spojeva kao što su galna kiselina i njezini derivati, flavonol glikozidi i antocijanini. Prisutni su i derivati miricetina, katehin te α - tokoferol u manjim količinama. Ulje dobiveno iz bobica u najvećoj količini sadrži α -pinen, mircen i limonen. Od ostalih bioaktivnih spojeva, tršlja je bogata i sekviterpenima, ketonima, alifatskim esterima i fenolnim spojevima, primjerice, timol i karvakrol (Nahida i sur., 2012; Benhammou i sur., 2008).



Slika 3. Kemijske strukture važnijih kemijskih sastojaka tršlje (Nahida i sur., 2012).

2.2. FENOLNI SPOJEVI TRŠLJE

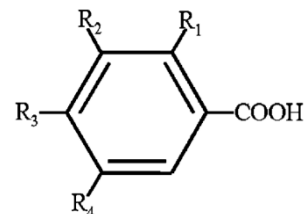
Fenolni spojevi su skupina aromatičnih, sekundarnih metabolita biljaka široko rasprostranjenih u cijelom biljnom kraljevstvu. Za njih je zabilježeno da posjeduju više bioloških učinaka, primjerice antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost. Biljni fenoli uključuju fenolne kiseline (derivati benzojeve i derivati cimetine kiseline), flavonoide (flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni i antocijanini), tanine te manje poznate lignane. Glavne vrste polifenola, fenolne kiseline i flavonoidi igraju ulogu u obrani od ultraljubičastog zračenja, napada patogena te doprinose obojenju biljke (Bampouli i sur., 2015; Dai i Mumper, 2010).

Tršlja čini bogat izvor polifenolnih spojeva antioksidacijskih aktivnosti (Dahmoune i sur., 2014). Polifenoli su antioksidansi s redoksnim svojstvima, koja im omogućuju da djeluju kao reducensi, donori vodika i razgrađivači kisika. Struktura im se sastoji od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina. Topljivi su u vodi jer se često pojavljuju kao glikozidi, a obično se nalaze u vakuoli stanice (Proestos i sur., 2005).

2.2.1. Fenolne kiseline

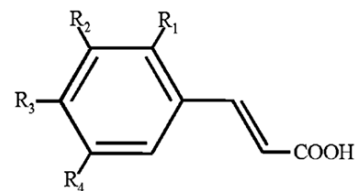
Fenolne kiseline su široko prisutne u ljudskoj prehrani te pokazuju bogat spektar bioloških i farmakoloških svojstava štiteći od oksidativnog stresa i njemu povezanih bolesti, poput karcinoma, upalnih poremećaja, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Strukturno uglavnom predstavljaju fenolni prsten, a funkcionalno su karboksilne kiseline (Zhang i sur., 2018). Fenolne kiseline se mogu podijeliti u dvije podskupine: hidroksibenzojeve kiseline (HBA) i hidroksicimetine kiseline (HCA). HBA se temelje na C6-C1 strukturi te uključuju *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, protokatehuinsku, vanilinsku, galnu i siriginsku kiselinu, dok su HCA aromatski spojevi s ugljikovim bočnim lancem (C6-C3), uključujući *p*-kumarinsku, kafeinsku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu (XU i sur., 2017).

Galna kiselina	$R_1 = H,; R_2 = R_3 = R_4 = OH$
Protokatehuinska kiselina	$R_1 = R_2 = H; R_3 = R_4 = OH$
<i>p</i>-hidroksibenzojeva kiselina	$R_1 = R_2 = R_4 = H; R_3 = OH$
Vanilinska kiselina	$R_1 = R_2 = H; R_3 = OH; R_4 = MeO$
Siriginska kiselina	$R_1 = H; R_2 = R_4 = MeO; R_3 = OH$



Slika 4. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Erdemgil i sur., 2007)

Kafeinska kiselina	$R_1 = R_2 = H; R_3 = R_4 = OH$
<i>p</i>-kumarinska kiselina	$R_1 = R_2 = R_4 = H; R_3 = OH$
Ferulinska kiselina	$R_1 = R_2 = H; R_3 = OH; R_4 = MeO$
Sinapinska kiselina	$R_1 = H; R_2 = R_4 = MeO; R_3 = OH$

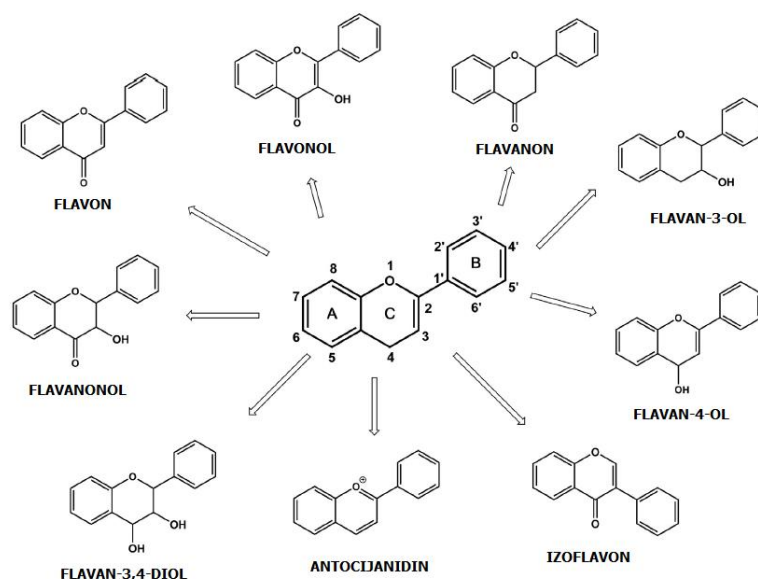


Slika 5. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Erdemgil i sur., 2007)

Najzastupljenija fenolna kiselina u lišću i bobicama tršlje je galna kiselina. Lišće sadrži i siringinsku i elaginsku kiselinu, dok su bobice bogatije 3,4-dihidroksicimetnom, benzojevom i salicilnom kiselinom (Mehenni i sur., 2016).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću skupinu fenolnih spojeva biljaka. Flavonoid se sastoji od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6) označenih kao **A**, **B** i **C** (Slika 6). **A** i **B** su aromatski prstenovi, a **C** je most s tri ugljika, obično u obliku heterocikličkog prstena (Xu i sur., 2017). Različiti razredi flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i supstituciji **C** prstena, dok se pojedinačni spojevi u razredu razlikuju prema supstituciji prstenova **A** i **B** (Kumar i Pandey, 2013). Flavonoidi iz prehrane su najčešće u glikoziliranom obliku te se glikozilacija flavonola najčešće odvija na C3 i C7 položaju, flavona na C7 poziciji, a antocijanidina na C3 i C5 položaju (Merken i Beecher, 2000).



Slika 6. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Raffa i sur., 2017).

Najzastupljeniji flavonoidi u lišću i bobicama tršlje jesu katehin, kvercetin i luteolin (Mehenni i sur., 2016). Lišće tršlje sadrži i brojne flavonole, flavonol glikozide i antocijane, na primjer miricetin, kamferol te manje količine kvercetin-3-O-ramnoze, delfinidin-3-O-glukozida i cijanidin-3-O-glukozida (Romani i sur., 2002).

2.2.3. Tanini

Tanini su još jedna skupina polifenola zastupljenih u prehrani i obično se dijele u dvije velike skupine: hidrolizirane tanine i kondenzirane tanine. Veliku raznolikost u strukturi tih spojeva daje njihova sposobnost stvaranja oksidativnog vezivanja (Dai i Mumper, 2010).

Prema Romani i suradnicima (2002) lišće tršlje sadrži velike količine visokomolekularnih tanina te je bogatije taninima nego flavonoidima.

2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE

U živim organizmima, raznim metaboličkim procesima i utjecajima okoliša, stvaraju se raznoliki reaktivni slobodni radikali. To su uglavnom reaktivne vrste kisika (ROS), čija povećana razina može oštetiti strukturu i mijenjati funkcije bioloških molekula te u konačnici uzrokovati staničnu smrt. Kumulativan učinak povećane razine ROS-a može povećati oksidativni stres na sustavnoj razini i manifestirati se u obliku različitih zdravstvenih problema kao što su karcinom i kardiovaskularne bolesti (Mishra, 2012).

Prema Benzie i Strainu (1999), biološki antioksidans je definiran kao „svaka tvar koja, kada je prisutna pri niskim koncentracijama u odnosu na oksidirajuće supstrate, značajno odgađa i sprječava oksidaciju tog supstrata“. Biljke sintetiziraju raznolik spektar antioksidacijskih fenolnih spojeva kao sekundarnih proizvoda koji sprečavaju oksidacijsko oštećenje u njih samih, ali također daju zaštitne učinke na ljude kada se konzumiraju kao hrana. Prirodni antioksidansi koji mogu neutralizirati ROS jesu cistein, reducirani glutation, polifenolni spojevi (antocijanini, flavonoidi, fenolne kiseline), karotenoidi (α -karoten, β -karoten likopen), askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) te indol karbinoli (Bhouri i sur., 2010).

Antioksidativna svojstva fenolnih spojeva odražavaju kombinaciju mehanizama, uključujući uklanjanje slobodnih radikala, doniranje vodika, suzbijanje singletnog kisika, kelaciju metalnih iona te djelovanje kao supstrat za oksidaciju. Antioksidansi iz hrane mogu djelovati zajedno kao sinergisti te na taj način učinkovitije smanjuju razine reaktivnih vrsta kisika, nego što bi to zasebno učinili (Gonçalves i sur., 2013).

FAZA INICIJACIJE



FAZA PROPAGACIJE



FAZA TERMINACIJE



Slika 7. Mehanizam nastanka, propagacije i terminacije radikala (CL, 2018)

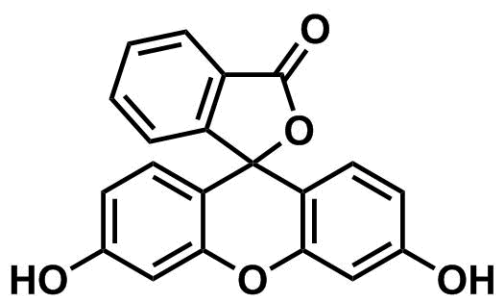
Tršlja sadrži brojne prirodne antioksidanse kao što su digalna kiselina, zaslužna za inhibiciju lipidne peroksidacije te galoihinska kiselina izolirana iz lišća koja djeluje na smanjenje oksidacije LDL-a, zatim 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza te galna kiselina kojima je također utvrđen visok antioksidativni učinak. Prirodna smola tršlje i bioaktivni terpeni iz eteričnog ulja pokazuju antioksidativna svojstva zbog kojih se koriste u proizvodnji funkcionalne hrane (Nahida i sur., 2012).

2.3.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

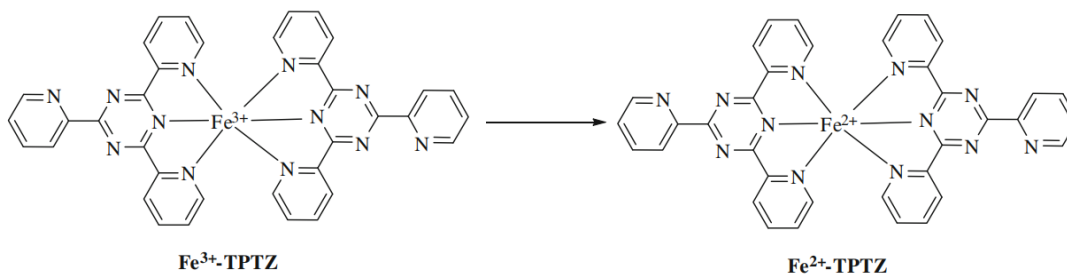
Razvijen je velik broj metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti, temeljenih na različitim mehanizmima odbrambenog sistema antioksidanasa poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili kelacije metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. Identifikacija i određivanje sadržaja različitih spojeva kojima se pripisuje antioksidativno djelovanje veoma je složeno, te se antioksidativna aktivnost određuje različitim metodama. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se direktne metode (ORAC metoda, određivanje s β -karotenom) i indirektne metode (DPPH, ABTS, FRAP) (Aličić i sur., 2013)

- **ORAC METODA**

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil-radikala ($\text{ROO}\cdot$) pri čemu antioksidanti zaustavljaju lančanu reakciju radikala. Peroksil-radikal oksidira fluorescein pri čemu nastaje produkt koji ne fluorescira, što se prilikom mjerenja manifestira smanjenjem inteziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).



Slika 8. Kemijska struktura fluoresceina (Anonymous 3)

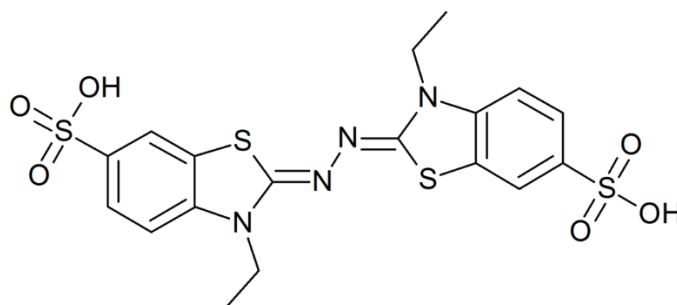


Slika 10. Oksidirani i reducirani oblik kompleksa željezo-TPTZ (Gülçin, 2011)

Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u prisutnosti antioksidanta i pri niskom pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorbancije na valnoj duljini 593 nm (Benzie i Strain, 1999).

- **ABTS METODA**

ABTS metoda je indirektna spektrofotometrijska metoda, koja se koristi za mjerenje ukupne antioksidacijske aktivnosti otopina čistih tvari. Temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog obojenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a (Re i sur., 1999)



Slika 11. Kemijska struktura ABTS (Anonymous 4)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Za istraživanje je korištena tršlja koja je brana na 4 različite lokacije. Uzorci lišća i bobica su prenošeni u vinskih vrećama i na dan berbe stavljeni su u prostoriju sobne temperature nakon čega su ostavljeni 5 dana da se posuše. Nakon 5 dana su samljeveni i stavljeni u plastične spremnike u frižider na temperaturu 4-5 °C.

Tablica 1 Datum berbe i lokacija uzoraka tršlje

	BERBA	KOORDINATE
LUN	5.5.2017.	44,683128/14,754214
KORČULA	4.5.2017.	42,961182/16,721574
BARBARIGA	5.5.2017.	44,991008/13,736675
HVAR	5.5.2017.	43,130962/16,942946

3.1.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupak ultrazvučne ekstrakcije

Otapalo:

- Destilirana voda
- 96 %-tna vodena otopina etanola

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Anhidrid natrijevog karbonata
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline

Priprema: Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Kemikalije i standardi za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaže se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: Odvaže se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaže se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L. Odvaže se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Ultrazvučna kupelj (Digital ultrasonic cleaner UC-50 A, BIOBASE, Shandong, Kina)
- Vortex MS2 Minishaker IKA

Pribor

- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete, volumena 100 μ L i 1000 μ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL, 500 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Lijevak
- Plastična ladica za vaganje
- Staklene kivete

3.2. METODE RADA

- Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski na 765 nm
- Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva tršlje

Lišće i bobice su zasebno usitnjeni kako bi se aktivni sastojci što bolje ekstrahirali. Odvagano je 1 g usitnjenog uzorka ($\pm 0,0001$) korištenjem analitičke vage i pomiješano s 40 mL otapala (70 %-tna vodena otopina etanola). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji 20 min na 50 °C nakon čega slijedi filtracija u tikvice od 50 mL te nadopuna otapalom do oznake.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode

Fenolni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim metodama, spektrofotometrijske su jednostavnije i praktičnije. Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid te molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Plavo obojenje bit će intenzivnije što je broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima veći (Singleton i sur., 1999).

Postupak određivanja

U staklenu se epruvetu redom otpipetira 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te se nakon 3 min doda 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Priređena smjesa se pomiješa pomoću Vortexa, a potom se termostatira 25 min pri $T = 50$ °C u kupelji od rotavapora. Potom slijedi mjerenje apsorbancije, odnosno optičke gustoće otopine pri valnoj duljini od 765 nm. Istim postupkom se priredi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Ukoliko je uzorak previše koncentriran, potrebno ga je razrijediti kako bi se mogao spektrofotometrijski detektirati.

Tablica 2. Razrjeđenja uzoraka tršlje za postupak određivanja ukupnih fenola

UZORAK		RAZRJEĐENJE
Korčula	List	30x
	Bobice	5x
Lun	List	10x
	Bobice	5x
Hvar	List	30x
	Bobice	10x
Barbariga	List	10x
	Bobice	5x

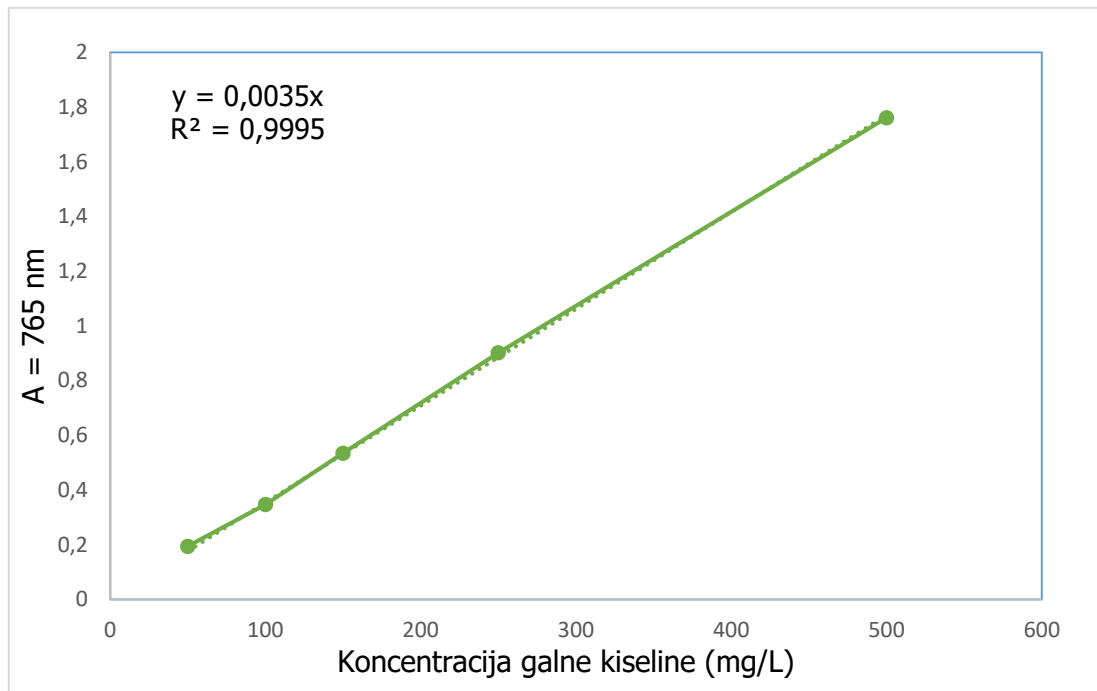
Izračunavanje

- Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca potrebno je odvagati 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od dobivene otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL, tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu pa se potom nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake se tikvice otpipetira 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagesna, 2 mL destilirane vode te se nakon 3 min doda 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa uz pomoć Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ u kupelji od rotavapora. Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

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



Slika 12. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0035x$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip metode

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). Reakcija je popraćena smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie i Strain, 1999). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinjeti konačnom rezultatu antioksidacijske aktivnosti. Reakcija prijenosa elektrona odvija se relativno brzo, najčešće u trajanju od 4 do 6 minuta, pa se njome može opisati antioksidacijska aktivnos onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1999).

Postupak određivanja

U staklene se epruvete najprije otpipetira 300 μL ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa, nakon čega se dobro promiješa te 10 min termostatira na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Potom se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Potrebno je napraviti i slijepu probu koja mora sadržavati sve navedeno osim samog uzorka umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Tablica 3. Razrjeđenja uzoraka tršlje za postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

UZORAK		RAZRJEĐENJE
Korčula	List	200x
	Bobice	25x
Lun	List	125x
	Bobice	50x
Hvar	List	200x
	Bobice	50x
Barbariga	List	125x
	Bobice	50x

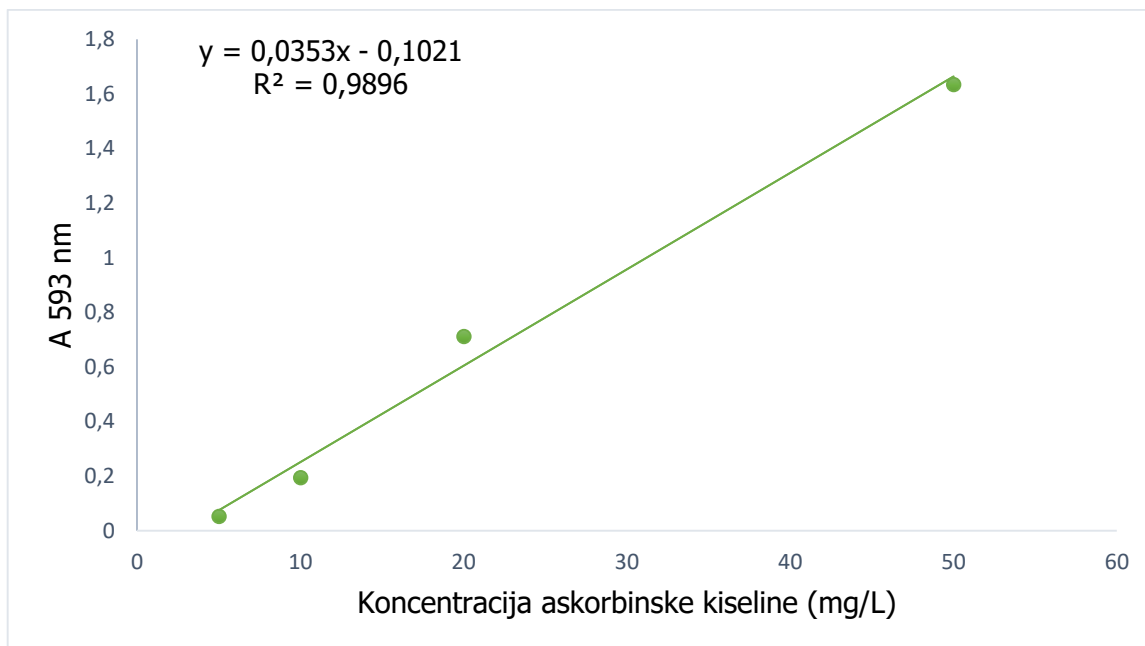
Izračunavanje

- Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0.5, 1, 2, 1 i 5 mL alikvot otopine askorbinske kiseline te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U staklene epruvete se otpipetira 300 μ L otopine standarda i 2250 μ L FRAP reagensa, smjesu je potrebno dobro promiješati te 10 min termostatirati na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Korištenjem izmjerenih vrijednosti apsorbancije, nacрта se baždarni pravac pomoću računalnog programa (Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) izraženih na apscisi te vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz dobivene jednadžbe pravca može se izračunati antioksidacijska aktivnost uzorka određena FRAP metodom.



Slika 13. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji askorbinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0353x - 0,1021$$

$$R^2 = 0,9896$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L)

Račun

Obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti s 2 (Fegredo i sur., 2009).

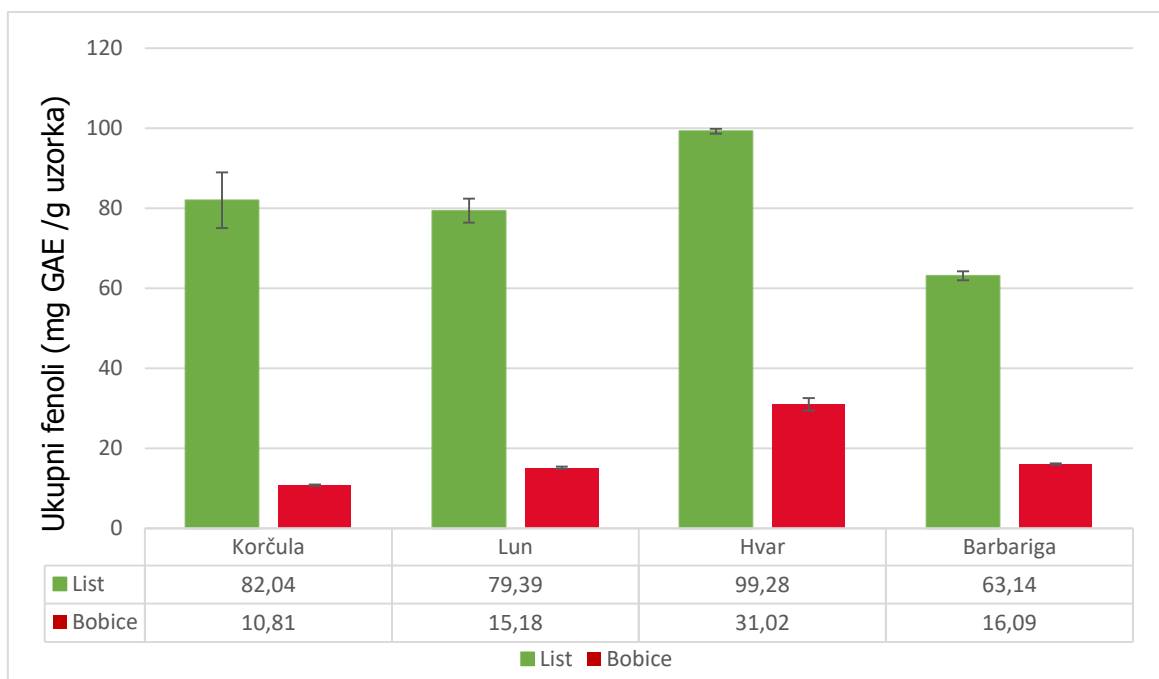
$$FRAP = \text{Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju određivani su maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva, te antioksidacijska aktivnost u ekstraktima koji su dobiveni iz lišća i bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) ubranih na četiri različite lokacije (Hvar, Lun, Korčula i Barbariga) u jednom terminu berbe. Količina ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski. Razlike u kemijskom sastavu tršlje pripisuju se varijaciji skupa čimbenika okoliša, kao što su temperatura zraka, precipitacija vode, izloženost vjetru, intenzitet sunčeve svjetlosti, UV zračenje i vlažnost zraka (Aissi i sur., 2016). Dosadašnja znanstvena istraživanja pokazala su da kvaliteta polifenolnih ekstrakata i njihovih antioksidacijskih svojstava ne ovise samo o kvaliteti početne biomase (zemljopisno podrijetlo, klimatski uvjeti, datum berbe te uvjeti skladištenja), već i o tehnološkim procesima koji su uključeni u njihovu proizvodnju (Dahmoune i sur., 2014).

4.1. UTJECAJ LOKACIJE NA KOLIČINU UKUPNIH FENOLA

Rezultati utjecaja lokacije na količinu ukupnih fenola u lišću i bobicama tršlje prikazani su grafički na slici 14., a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

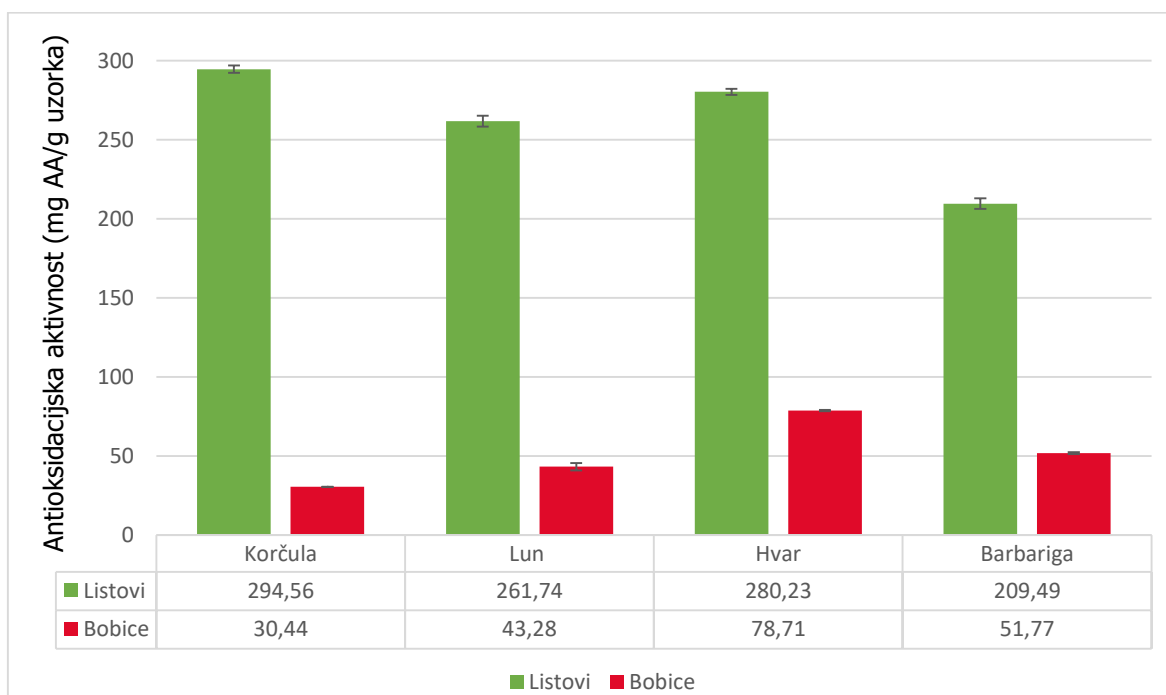


Slika 14. Utjecaj lokacije na količinu ukupnih fenola u lišću i bobicama tršlje

Rezultati pokazuju da listovi u odnosu na bobice tršlje sadrže značajno veću količinu fenolnih spojeva koja se kreće u rasponu od 63,14 mg GAE/g do 99,28 mg GAE/g za listove te 10,81 mg GAE/g do 31,02 mg GAE/g za bobice. Prema Romani i suradnicima (2002) ukupna količina fenolnih spojeva u listovima tršlje čini čak 7,5 % njihove suhe mase. S obzirom na lokaciju, tršlja iz Hvara sadži najveću količinu ukupnih fenola koja iznosi 99,28 mg GAE/g u listovima i 31,02 mg GAE/g u bobicama, dok je najmanja količina fenola zabilježena u listovima tršlje ubrane u Barbarigi te iznosi 63,14 mg GAE/g, a najmanja količina fenola u bobicama zabilježena je na Korčuli te iznosi 10,81 mg GAE/g. Prema Barbouchi i suradnicima (2018) vrijednost ukupnih fenola tršlje brane na dvije lokacije u Maroku, kreće se od 243,90 mg GAE/g do 255,85 mg GAE/g za lišće te od 125,61 mg GAE/g do 127,02 mg GAE/g za bobice. Vrijednosti ukupnih fenola tršlje ubrane u Maroku su znatno više od vrijednosti tršlje iz područja Hrvatske što se može pripisati različitim odabirom otapala i postupaka ekstrakcije te o samim uvjetima rasta biljke.

4.2. UTJECAJ LOKACIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Antioksidacijska aktivnost listova i bobica tršlje ubranih na četiri različite lokacije uzgoja, određena je primjenom FRAP metode. Slika 15. prikazuje rezultate izražene u obliku srednje vrijednosti dvaju paralelnih mjerenja.



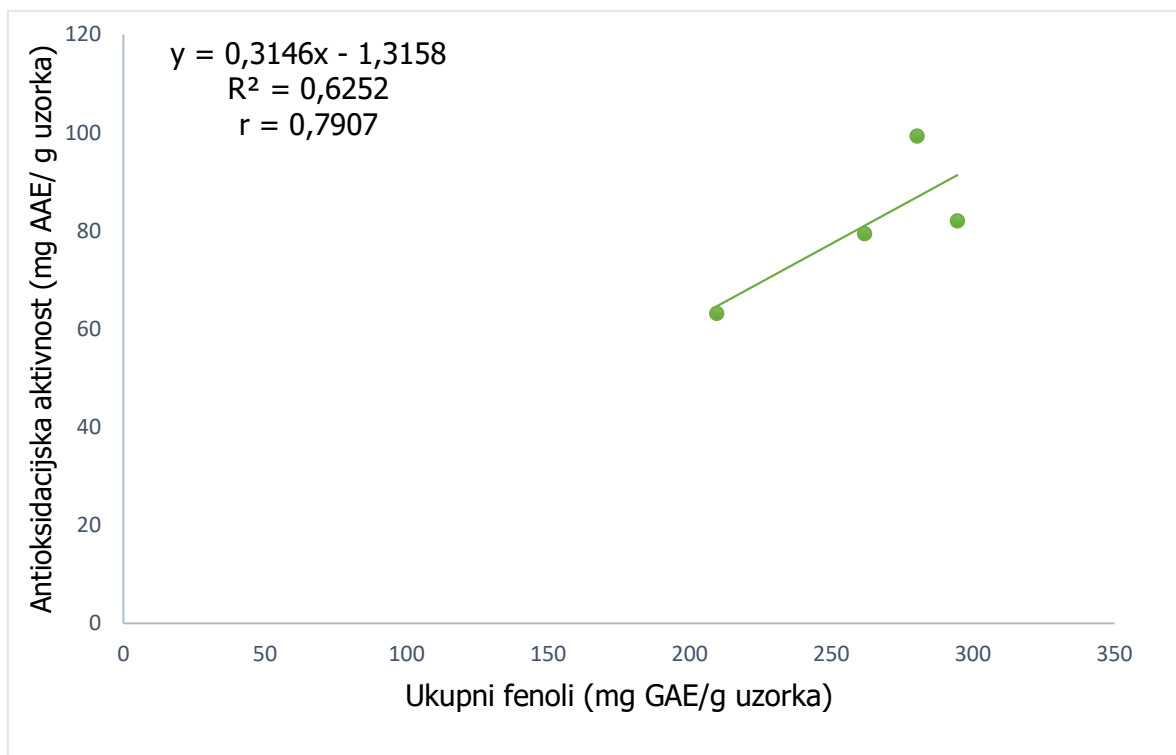
Slika 15. Utjecaj lokacije na antioksidacijsku aktivnost u lišću i bobicama tršlje

Rezultati upućuju na veću antioksidacijsku aktivnost listova u odnosu na bobice tršlje što je u skladu sa količinom fenolnih spojeva. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti listova tršlje dobivenih FRAP metodom kreću se od 209,49 mg AAE/g do 294,5564 mg AAE/g. Najniža vrijednost zabilježena je u listova tršlje ubranih na području Barbarige, dok je najviša vrijednost zabilježena na području Korčule. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bobica tršlje su značajno niže te se kreću od 30,4377 mg AAE/g do 78,7121 mg AAE/g. Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti bobica tršlje zabilježena je na području Korčule, dok je najveća vrijednost iz područja Hvara.

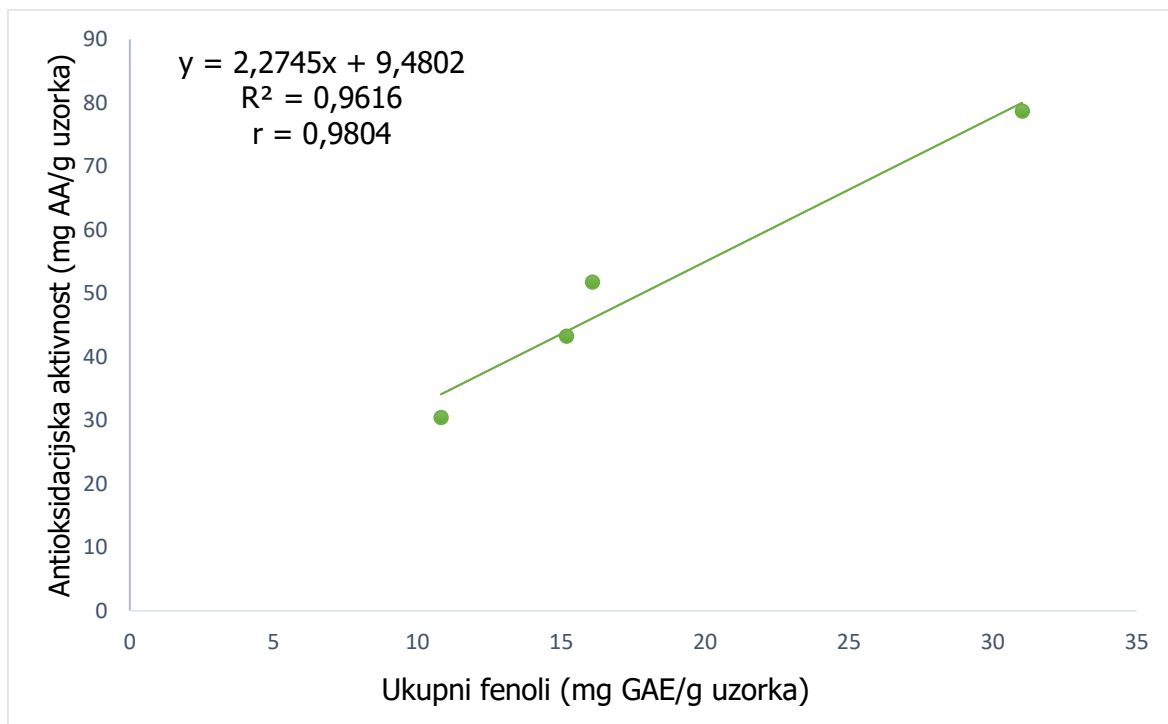
Prema Cherbal i suradnicima (2012) etanolni ekstrakt listova tršlje, određivan DPPH metodom, ima visok potencijal gašenja slobodnih radikala, koji iznosi od 78 do 90,29 % u odnosu na BHA standard. Također, Atmani i suradnici (2009) dokazuju vrlo visoku sposobnost uklanjanja DPPH radikala ($IC_{50} = 4.24 \mu\text{g/ml}$) u kloroformnom ekstraktu listova tršlje. Varijacije između antioksidacijske aktivnosti između listova mogu biti zbog različitog stupnja starosti jer antioksidacijska aktivnost slabi proporcionalno sa starenjem listova (Munné-Bosch i Peñuelas, 2003).

4.3. KORELACIJA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI LIŠĆA I BOBICA TRŠLJE

Slike 16. i 17. prikazuju ispitivanu korelaciju između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određivanih FRAP metodom. Utvrđena je vrlo dobra linearna korelacija pri čemu koeficijent korelacije za listove iznosi $r = 0,79$, a za bobice $r = 0,98$.



Slika 16. Korelacija ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti uzoraka listova tršlje



Slika 17. Korelacija ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti uzoraka bobica tršlje

Na temelju utvrđenih linearnih korelacija može se zaključiti da su fenoli u analiziranim uzorcima listova i bobica glavni prinos antioksidacijskoj aktivnosti tršlje. Koeficijenti korelacije su u skladu sa korelacijom utvrđenom na temelju rezultata provedenog u Alžiru gdje je $r = 0,96$ (Atmani i sur., 2009) te istraživanja provedenog u Maroku gdje je $r = 0,98$ (Barbouchi i sur., 2018).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti:

1. Ekstrakti listova tršlje sadrže značajno veći maseni udio ukupnih fenola u usporedbi s bobicama (od 63,14 mg GAE/g do 99,28 mg GAE/g). Koncentracija ukupnih fenola u listovima bila je 3 do 7 puta veća nego u bobicama tršlje.
2. Ekstrakti listova tršlje sadrže značajno veću antioksidacijsku aktivnost odnosu na bobice (od 209,4953 mg AA/g do 294,5564 mg AA/g).
3. Najveće vrijednosti ukupnih fenola sadrže ekstrakti listova tršlje ubrane na području Hvara koje iznose 99,28 mg GAE/g u listovima i 31,02 mg GAE/g u bobicama.
4. Najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti sadrže listovi tršlje ubrane na području Korčule koja iznosi 294,5564 mg AA/g, dok najveću antioksidacijsku aktivnost bobica sadrži tršlja ubrana na području Hvara sa 78,78 mg AA/g.
5. Utvrđena je vrlo dobra linearna korelacija između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti, pri čemu koeficijent korelacije za listove iznosi $r = 0,79$ ($R^2 = 0,63$), a za bobice $r = 0,98$ ($R^2 = 0,96$).

6. LITERATURA

Aissi, O., Boussaid, M. i Messaoud, C. (2016) Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, **91**: 56-65.

Aličić, D., Šubarić, D., Jašić, M., Pašalić, H. i Ačkar, D. (2013) Antioxidant properties of pollen. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, **3**(1): 6-12.

Anonymous 1 (2015) < <https://www.plantea.com.hr/trslja/> >. Pristupljeno 20. svibnja 2018.

Anonymous 2 (2014) < [https://en.wikipedia.org/wiki/Mastic_\(plant_resin\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Mastic_(plant_resin)) >. Pristupljeno 20. svibnja 2018.

Anonymous 3 (2018) < <https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein> >. Pristupljeno 21. lipnja 2018.

Anonymous 4 (2007) < <https://en.wikipedia.org/wiki/ABTS> >. Pristupljeno 21. lipnja 2018.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N. i Atmani, D. (2009) Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, **112**(2): 303-309.

Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K. i Krokida, M. (2015) Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering* **167**: 25-31.

Barbouchi, M., Elamrani, K., El Idrissi, M. i Choukrad, M. (2018) A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of different solvent extracts from various parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of King Saud University - Science*.

Beghlal, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L. i Mohamed, B. (2016) Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **6**(4): 16.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F. i Kadifkova Panovska, T. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African journal of pharmacy and pharmacology*, **2**(2): 22-28.

Benzie, I. i Strain, J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Oxidants and Antioxidants Part A* 15-27.

Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlef, I., Sghaier, M., Kilani, S., Mariotte, A., Dijoux-Franca, M., Ghedira, K. i Chekir-Ghedira, L. (2010) Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from Pistacia lentiscus fruits. *Toxicology in Vitro*, **24**(2): 509-515.

Cao, G., Alessio, H. i Cutler, R. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, **14**(3): 303-311.

Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K. i El-Adawi, H. (2012) Extraction and Valorization of Phenolic Compounds of Leaves of Algerian Pistacia lentiscus. *Asian Journal of Plant Sciences*, **11**(3): 131-136.

CL (2018) Chemistry LibreTexts,

<[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/17%3A_Radical_reactions/17.2%3A_Radical_chain_reactions](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/17%3A_Radical_reactions/17.2%3A_Radical_chain_reactions)>. Pristupljeno 15. svibnja 2018.

Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A. i 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.

Dai, J. i Mumper, R. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**(10): 7313-7352.

Erdemgil, F., Sanli, S., Sanli, N., Ozkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J. i Beltran, J. (2007) Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, **72**(2): 489-496.

Fegredo, J.A., Wong, M.C.Y., Wiseman, H., Preedy, V.R., (2009) Chapter 97 - Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego: 991-1002.

- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P. i Romano, A. (2013) The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, **43**: 465-471.
- Gülçin, İ. (2011) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86**(3): 345-391.
- Kumar, S. i Pandey, A. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, **2013**: 1-16.
- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P. i Atmani, D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of Pistacia lentiscus leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, **24**(3): 653-669.
- Merken, H. i Beecher, G. (2000) Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(3): 577-599.
- Mishra, K., Ojha, H. i Chaudhury, N. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, **130**(4): 1036-1043.
- Munné-Bosch, S. i Peñuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown Phillyrea angustifolia plants. *Planta*, **217**(5): 758-766.
- Nahida, Ansari, S. i Siddiqui, A. (2012) Pistacia lentiscus: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 16-20.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. i Deemer, E. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(11): 3122-3128.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G. i Komaitis, M. (2005). RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(4): 1190.
- Pyrzyska, K. i Pełal, A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**(17): 4288.

Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M., Plescia, F. i Daidone, G. (2017) Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* **142**: 213-228.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. i Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**(9-10): 1231-1237.

Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N. i Tattini, M. (2002) Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis* **13**(2): 79-86.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**(4): 828-834

Singleton, V., Orthofer, R. i Lamuela-Raventós, R. (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*: 152-178.

Tolić, I. (2003) Commercial and other values of the genus *Pistacia* species. *Šumarski list* (9-10): 501-507.

Xu, C., Wang, B., Pu, Y., Tao, J. i Zhang, T. (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **15**(10): 721-731.

Zhang, Y., Wu, S., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q., Ren, F. i Zhang, H. (2018) Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry* **240**: 1072-1080.

Izjava o izvornosti

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

Mateja Cestar

Ime i prezime studenta