

# Antioksidacijska aktivnost ekstrakata mediteranskog bilja dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom

---

Škarica, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:700254>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Iva Škarica**  
**7264/PT**

**ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA MEDITERANSKOG BILJA DOBIVENIH  
KONVENCIONALNOM EKSTRAKCIJOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Začinsko i aromatsko bilje

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambenu tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Antioksidacijska aktivnost ekstrakata mediteranskog bilja dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom**

*Iva Škarica, 0058209099*

**Sažetak:** Antioksidansi mogu odgoditi, inhibirati ili spriječiti oksidaciju molekula uklanjanjem slobodnih radikala te na taj način smanjuju oksidacijski stres. Glavni sekundarni metaboliti mirte su polifenoli te eterična ulja. Metanolni ekstrakti tamnoplavih plodova mirte su pokazali viši redukcijski potencijal DPPH• ( $IC_{50} = 2,1$  mg/ml) te veće FRAP vrijednosti ( $2,7$  mmol  $Fe^{2+}$ /g) u odnosu na bijele plodove. Rogač sadrži velike količine polifenolnih spojeva, osobito tanina koji čine 18 – 20 % sastava te se u plodovima koncentracija polifenola kreće u rasponu od 45 – 5376 mg GAE/ 100g. Rezultati DPPH• analiza za metanolne ekstrakte kore rogača su pokazali da vrijednosti  $IC_{50}$  variraju između 0,7 g/L do 1,8 g/L, a za etil-acetatne ekstrakte  $IC_{50}$  iznosi od 1,6 g/L do 2,8 g/L. U lišću tršlje je koncentracija galoilnih derivata vrlo visoka te su prisutne i značajne količine derivata miricetina koji čine oko 1,5 % s.t. Ekstrakti listova pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost ispitivanu ORAC metodom ( $5865 \pm 406$  mol TE/100gE) u usporedbi s plodovima tršlje ( $3664 \pm 07$  mol TE/100gE).

**Ključne riječi:** antioksidansi, ekstrakcija, mirta, rogač, tršlja

**Rad sadrži:** 32 stranice, 11 slika, 0 tablica, 44 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:** Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*

**Datum obrane:** 15.06.2020.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb**

**Bachelor thesis**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **Antioxidant activity of Mediterranean herb extracts obtained by conventional extraction**

***Iva Škarica, 0058209099***

**Abstract:** Antioxidants can delay, inhibit or prevent the oxidation of molecules by removing free radicals, thus reducing oxidative stress. The main secondary metabolites of myrtle are polyphenols and essential oils. Methanolic extracts of dark blue myrtle fruits showed a higher reduction potential of DPPH• ( $IC_{50} = 2,1$  mg/ml) and higher FRAP values ( $2,7$  mmol  $Fe^{2+}$ /g) compared to white fruits. Carob contains large amounts of polyphenolic compounds, especially tannins, which make up 18 – 20 % of the composition, and in fruits the concentration of polyphenols ranges from 45 - 5376 mg GAE / 100g. Results of DPPH• assays for methanolic extracts of carob bark showed that  $IC_{50}$  values vary between 0,7 g/L to 1,8 g/L and for ethyl acetate extracts  $IC_{50}$  is from 1,6 g/L to 2,8 g/L. The concentration of galoyl derivatives in mastic tree leaves is very high and significant amounts of myricetin derivatives are present, which make up about 1,5 % of d.w. Leaf extracts show higher antioxidant activity tested by the ORAC method ( $5865 \pm 406$  mol TE / 100gE) compared to mastic fruits ( $3664 \pm 07$  mol TE / 100gE).

**Keywords:** antioxidants, carob, extraction, mastic tree, myrtle

**Thesis contains:** 32 pages, 11 figures, 0 tables, 44 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Sandra Balbino

**Defence date:** 15.06.2020.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Antioksidacijska aktivnost .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Oksidacija i oksidacijski stres.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Antioksidansi i antioksidacijski kapacitet.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti .....</b>	<b>7</b>
<b>3. METODE EKSTRAKCIJA ANTIOKSIDANSA IZ BILJAKA.....</b>	<b>10</b>
<b>4. MIRTA.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Botanička i morfološka svojstva mirte .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Kemijski sastav mirte .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Eterična ulja mirte.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4. Masne kiseline mirte.....</b>	<b>15</b>
<b>4.5. Fenolni spojevi mirte i antioksidacijska aktivnost.....</b>	<b>16</b>
<b>4.6. Ljekovita svojstva mirte .....</b>	<b>17</b>
<b>5. ROGAČ .....</b>	<b>18</b>
<b>5.1. Botanička i morfološka svojstva rogača .....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Kemijski sastav rogača .....</b>	<b>19</b>
<b>5.3. Masne kiseline rogača .....</b>	<b>19</b>
<b>5.4. Fenolni spojevi rogača i antioksidacijska aktivnost .....</b>	<b>20</b>
<b>5.5. Ljekovita svojstva rogača.....</b>	<b>21</b>
<b>6. TRŠLJA.....</b>	<b>22</b>
<b>6.1. Botanička i morfološka svojstva tršlje .....</b>	<b>22</b>
<b>6.2. Kemijski sastav tršlje.....</b>	<b>23</b>
<b>6.3. Fenolni spojevi tršlje i antioksidacijska aktivnost .....</b>	<b>24</b>

<b>6.4.</b>	Masne kiseline tršlje .....	25
<b>6.5.</b>	Učinci tršlje na zdravlje.....	25
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>27</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	<b>28</b>

## 1. UVOD

Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između nastanka slobodnih radikala i reaktivnih metabolita i njihovog uklanjanja zaštitnim mehanizmima koja dovodi do oštećenja prirodnih molekula poput lipida, ugljikohidrata i DNK u stanicama i tkivima. Posljedice oksidacijskog stresa grade molekularnu osnovu u razvoju kardiovaskularnih bolesti, raka, neurodegenerativnih poremećaja, dijabetesa te autoimunih poremećaja (Vladimir - Knežević i sur., 2012). Antioksidansi su spojevi koji odgađaju, inhibiraju ili sprječavaju oksidaciju molekula na način da zaustavljaju lančane reakcije do kojih dolazi tvorbom slobodnih radikala te tako smanjuju oksidacijski stres (Antolovich i sur., 2002; Vladimir - Knežević i sur., 2012). Prior i sur. (2005) navode kako se, ovisno o mehanizmima reakcija koji se odvijaju između antioksidansa i slobodnih radikala, metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti dijele na one temeljene na prijenosu elektrona, metode temeljene na prijenosu vodika te na ostale metode. Brojne biljne vrste sadrže bioaktivne tvari poput antioksidanasa koji se iz njih dobivaju različitim metodama ekstrakcije. Ekstrakcija podrazumijeva tehnološku operaciju pri kojoj dolazi do djelomičnog ili potpunog razdvajanja smjese tvari koje nemaju jednaku topivost u različitim otapalima. Provodi se primjenom odgovarajućih otapala iz krutine ili tekućine u kojoj se nalazi željena tvar. (Režek Jambrak i Drmić, 2010). Mediteransko bilje predstavlja bogat izvor antioksidansa, a budući da mirta, rogač i tršlja sadrže eterična ulja te plodove sa sjemenkama, potencijalno bi se mogle koristiti za proizvodnju ulja. Mirta (*Myrtus communis* L.) je tisućljetni lijek i začim na hrvatskim otocima te se u pučkoj medicini upotrebljava za liječenje raznih bolesti (Lesinger, 2006). Glavni sekundarni metaboliti mirte su polifenoli te eterična ulja, a općenito najčešći spojevi pronađeni u listovima, stabljikama i cvjetovima mirte su 1,8-cineol i  $\alpha$ -pinen (Aleksić i Knežević, 2014). Rogač (*Ceratonia siliqua* L.) se, upravo zato što obiluje tisućama fitokemijskih komponenti, može koristiti u liječenju raznih bolesti. Sadrži velike količine polifenolnih spojeva, osobito tanina za koje je utvrđeno da čine 18 – 20 % sastava, a osim tanina utvrđeni su i flavonoidi koji su pokazali snažno antioksidacijsko djelovanje (Zannou i sur., 2019). Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je dvodomna vrsta rasprostranjena na Sredozemlju iz čije kore, kada se zareže, curi mirisni smolasti sok zvan mastiks, a iz prokuhanih plodova se dobiva masno ulje te su joj listovi bogati taninima (Kovačić i sur., 2008). Tri glavne skupine sekundarnih metabolita koje se pojavljuju kod tršlje su galna kiselina te njeni derivati, flavonolni glikozidi te antocijanini (Benhammou i sur., 2007).

Cilj ovoga rada je istražiti koje sve antioksidanse sadrže ove biljke te kakva je antioksidacijska aktivnost ekstrakata dobivenih konvencionalnim metodama ekstrakcije. Režek Jambrak i sur.

(2011) navode kako se za ekstrakciju mogu koristiti različite konvencionalne metode kao što su destilacija i ekstrakcija otapalima koje podrazumijevaju ekstrakciju u užem smislu te mehanička ekstrakcija u koju ubrajamo hladno prešanje.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Antioksidacijska aktivnost

#### 2.1.1. Oksidacija i oksidacijski stres

Oksidacija je otpuštanje jednog ili više elektrona iz molekule, a suprotno tome, redukcija je definirana kao primanje jednog ili više elektrona. Ravnoteža između oksidacije i redukcije je potrebna u svim kemijskim reakcijama, što znači da kada se jedna tvar oksidira, druga se mora reducirati. Molekularne promjene posredovane pomacima u redoks ravnoteži mogu promijeniti stanične funkcije kao odgovor na stimulaciju transdukcijom signala ili mogu pridonijeti oštećenju stanica i tkiva, ovisno o prirodi i opsegu učinjenih pomaka (Siraki i sur., 2018).

Slobodni radikal je svaki atom ili skupina koja ima jedan ili više nesparenih elektrona te može biti električki nabijen ili nenabijen. Zajedničko svim radikalima je njihova visoka kemijska reaktivnost koja je u vezi s težnjom elektrona da se sparuju. Slobodni radikali mogu nastati na dva načina:

1. Homolitičkim cijepanjem veza u molekulama:  $A-B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$
2. Reakcijama molekula s drugim slobodnim radikalima:  $A-B + X^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + B-X$  (Pine, 1987).

Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita, tzv. reaktivnih kisikovih vrsta (ROS – *Reactive Oxygen Species*), i njihovog uklanjanja zaštitnim mehanizmima, antioksidansima, a ta neravnoteža dovodi do oštećenja važnih prirodnih molekula i stanica što može utjecati na cijeli organizam. Oksidacijski stres može uzrokovati oštećenje lipida, proteina, ugljikohidrata i DNK u stanicama i tkivima te rezultira oštećenjem membrane, fragmentacijom ili slučajnim umrežavanjem molekula poput DNK, enzima i strukturnih proteina. Navedene promjene mogu dovesti do stanične smrti izazvane fragmentacijom DNK i peroksidacijom lipida, a upravo ove posljedice oksidativnog stresa grade molekularnu osnovu u razvoju kardiovaskularnih bolesti, raka, neurodegenerativnih poremećaja, dijabetesa i autoimunih poremećaja.

Reaktivne kisikove vrste nastaju u stanicama dišnim lancem na membranama mitohondrija kao produkti normalnog staničnog metabolizma te imaju vitalnu ulogu u stimulaciji signalnih putova u stanicama kao odgovor na promjene unutar- i izvanstaničnih uvjeta okoliša. Tijekom endogenih metaboličkih reakcija dolazi do redukcije molekularnog kisika pri čemu aerobne stanice stvaraju

reaktivne čestice poput superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksilnog radikala ( $OH^{\bullet}$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i organskih peroksida kao normalnih produkata (Vladimir - Knežević i sur., 2012).

### 2.1.2. Antioksidansi i antioksidacijski kapacitet

Antioksidansi su spojevi koji usporavaju i sprječavaju oksidaciju molekula na način da zaustavljaju lančane reakcije do kojih dolazi tvorbom slobodnih radikala, a to čine tako da uklanjaju međuprodukte slobodnih radikala te usporavaju i druge oksidacijske procese (Antolovich i sur., 2002). U uvjetima kada nastupe bolesti, obrana protiv reaktivnih kisikovih vrsta je oslabljena te se povećava oksidacijsko opterećenje, stoga je u takvim uvjetima vanjska opskrba antioksidansima važna za uklanjanje štetnih posljedica oksidacijskog stresa (Vladimir - Knežević i sur., 2012). Antioksidanse dijelimo na primarne i sekundarne, pri čemu primarni antioksidansi prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala te sprječavaju njihovu daljnju tvorbu, a sekundarni inhibiraju brzinu oksidacije (Antolovich i sur., 2002).

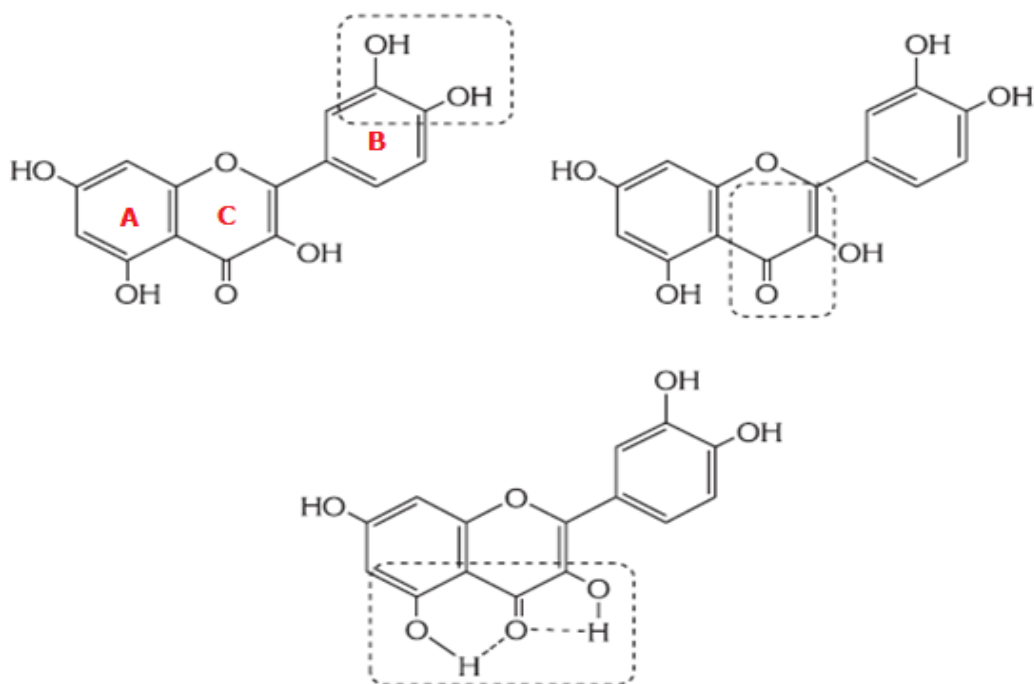
Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina tvari te je trenutno poznato više od 8000 fenolnih struktura. U skupinu polifenola pripadaju jednostavne molekule poput fenolnih kiselina pa sve do visoko polimeriziranih spojeva poput tanina, a uglavnom se pojavljuju u konjugiranom obliku, s jednim ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilne skupine, iako postoje i jedinice šećera koje su direktno povezane s aromatskim ugljikom. Vezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi ili oligosaharidi, pri čemu je glukoza najčešći šećer, a mogu biti prisutne i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza, glukuronska i galakturonska kiselina te mnogi drugi. Često su fenoli vezani i s drugim spojevima poput karboksilnih i organskih kiselina, amina i lipida ili su vezani s drugim fenolima (Bravo, 1998). Polifenoli mogu djelovati kao primarni antioksidansi pomoću brojnih potencijalnih mehanizama, a najvažniji mehanizmi su razbijanje lančane reakcije slobodnih radikala te suzbijanje stvaranja slobodnih radikala reguliranjem aktivnosti enzima. Osim navedenih, potencijalni antioksidacijski mehanizam također može biti interakcija polifenolnih spojeva s drugim fiziološkim antioksidansima (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

Rastija i Medić - Šarić (2009) navode kako se polifenoli mogu podijeliti na fenolne kiseline, stilbene i flavonoide. U skupinu fenolnih kiselina ubrajamo derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida, tj. flavonoidi koji nemaju vezane šećere, imaju strukturu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> te su pritom atomi ugljika raspoređeni na način da propanski lanac povezuje dvije benzenske jezgre, pri čemu propanski lanac može tvoriti treći prsten. Stilbeni su polifenoli bez osnovne strukture flavonoida, a funkcionalna skupina im je 1,2-difeniletan.

Flavonoidi (FI) mogu imati antioksidacijski učinak na nekoliko načina, a najvažniji je da mogu biti hvatači slobodnih radikala uslijed čega nastaje slabije reaktivan flavonoidni fenoksi radikal (FI-O•), kako vidimo u sljedećim reakcijama:

1.  $\text{ROO}^\bullet + \text{FI-RO} \rightarrow \text{OH} + \text{FI-O}^\bullet$
2.  $\text{HO}^\bullet + \text{FI-OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{FI-O}^\bullet$

Strukturalna svojstva flavonoida koja su važna za hvatanje slobodnih radikala su: o-dihidroksilna struktura u prstenu B koja stabilizira radikal i omogućuje premještanje elektrona; 2,3-dvostruka veza koja je u konjugaciji s 4-keto-skupinom omogućuje premještanje elektrona iz prstena B te 3- i 5- hidroksilne grupe koje omogućuju tvorbu vodikove veze s keto-skupinom (Kazazić, 2004).



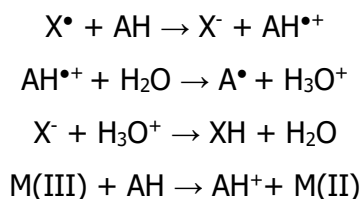
**Slika 1.** Strukturna svojstva flavonoida važna za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

### 2.1.3. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

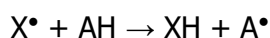
Prior i sur. (2005) navode kako se, ovisno o mehanizmima reakcija koji se odvijaju između antioksidansa i slobodnih radikala, metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti dijele na:

1. Metode temeljene na prijenosu elektrona (engl. SET - Single Electron Transfer)
2. Metode temeljene na prijenosu vodika (engl. HAT - Hydrogen Atom Transfer)
3. Ostale metode.

Metode temeljene na prijenosu elektrona (SET metode) mjere reduksijsku sposobnost antioksidansa te se baziraju na redoks reakcijama. Kod SET metoda antioksidans (AH) reakcijom prijenosa jednog elektrona reducira neku tvar, primjerice metale, karbonile i radikale, što se može prikazati reakcijama:



Metode temeljene na mehanizmu prijenosa vodika (HAT) mjere sposobnost antioksidansa da „hvata“ slobodne radikale donirajući im vodikov atom, što je vidljivo iz reakcije:



HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH te su uglavnom prilično brze. Prisutnost reducirajućih sredstava, uključujući metale, predstavlja komplikaciju u HAT testovima i može dovesti do pogrešno visoke prividne reaktivnosti. U HAT reakciji se molekula slobodnog radikala „gasi“ reakcijom prijenosa atoma vodika pri čemu nastaje radikal antioksidansa koji je manje reaktivan.

Najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su:

SET metode: FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (engl. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), ABTS (prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) te FC (Folin-Ciocalteu metoda).

U HAT metode se ubrajaju: ORAC (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity), DPPH (prema radikalu 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil), TRAP (engl. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter),

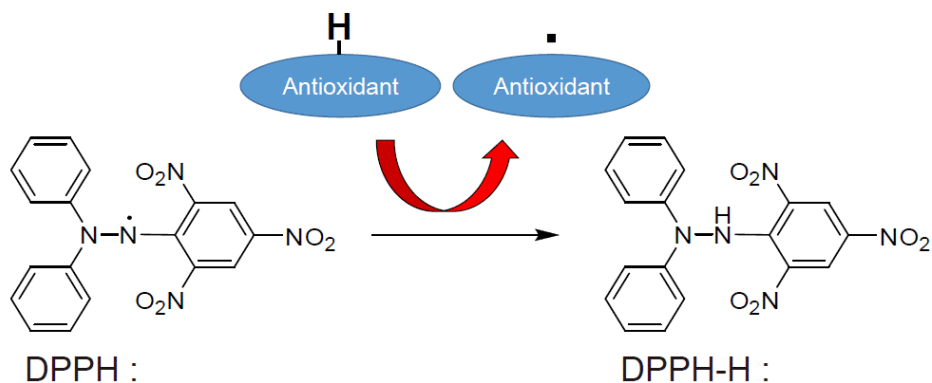
$\beta$ -karoten (metoda koja se temelji na izbjeljivanju  $\beta$ -karotena) te SASA (engl. Scavenging of Superoxide Radical Formation by Alkaline).

Ostale metode koje se mogu upotrijebiti za određivanje antioksidacijske aktivnosti su: TOSC (engl. Total Oxidant Scavenging Capacity), BR (inhibicija Briggs-Rauscher oscilacijske reakcije), kelatiranje (sposobnost stvaranja kelata s ionima željeza/bakra), CL (kemiluminiscencija) te PCL (fotokemiluminiscencija) (Generalić, 2011).

Antioksidacijski kapacitet se najčešće izražava TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja se definira kao  $\text{mmol/dm}^3$  koncentracija otopine analoga vitamina E, troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), topivog u vodi, jednake antioksidacijske aktivnosti kao i  $1 \text{ mmol/dm}^3$  otopina flavonoida koji se ispituje. Za izražavanje antiradikalske aktivnosti flavonoida promatra se sposobnost reagiranja flavonoida s određenim radikalima, primjerice mjerenjem obezbojenja stabilnog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilnog radikala (DPPH) (Kazazić, 2004).

#### DPPH metoda

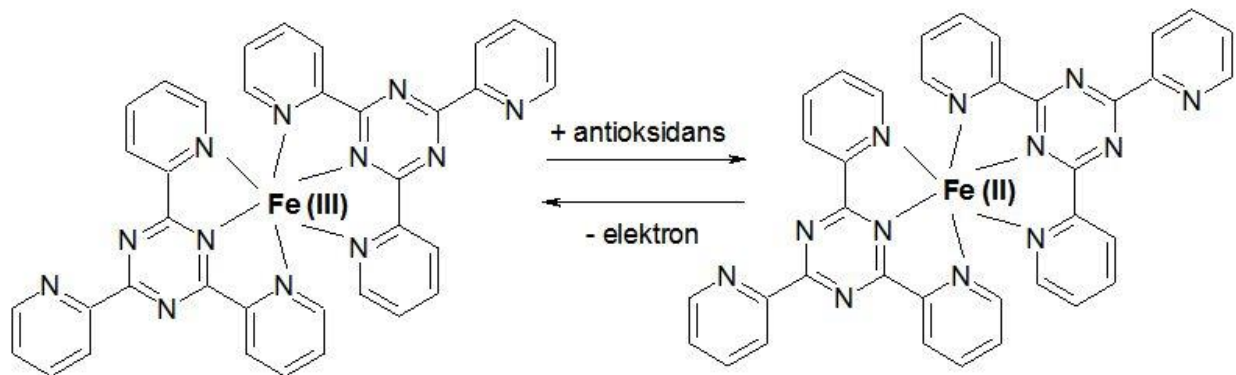
Ovom metodom se određuje reaktivnost ispitivanog spoja sa stabilnim slobodnim radikalom. Budući da stabilni slobodni radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) sadrži nesporeni elektron, on jako apsorbira na valnoj duljini 517 nm u vidljivom dijelu spektra te interakcija ovog ljubičasto obojenog slobodnog radikala s antioksidansom koji može neutralizirati svojstvo slobodnih radikala, vodi do stvaranja difenilpikrilhidrazina žute boje, a nastala promjena boje se može kvantificirati spektrofotometrijski (Kazazić, 2004; Vladimir - Knežević i sur., 2012).



**Slika 2.** Prikaz antioksidacijskog djelovanja na slobodni radikal DPPH (Anonymous 1)

## FRAP metoda

Mehanizam ove reakcije se temelji na izmjeni jednog elektrona pri čemu dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa  $\text{Fe}^{\text{III}}$  - TPTZ u  $\text{Fe}^{\text{II}}$  oblik uz prisutnost antioksidansa i pri kiselom pH te nastaje plavo obojenje čija je maksimalna apsorpcija pri 593 nm. Ova je metoda brza i jednostavna, reagensi su jeftini te su rezultati ponovljivi u velikom opsegu koncentracija (Generalić, 2011).



**Slika 3.** FRAP reakcija (Kesić i sur., 2015)

## ORAC metoda

ORAC metoda je antioksidacijska metoda iz skupine HAT koja se temelji na mjerenju inhibicije oksidacije izazvane peroksilnim radikalima te je ova metoda klasičan primjer antioksidacijske aktivnosti temeljen na sprječavanju lančanih reakcija slobodnih radikala. Reakcija se temelji na tome da peroksilni radikal reagira s fluoresceinom, čime nastaje nefluorescentni produkt, koji se lako može kvantificirati fluorescencijom te se antioksidacijski kapacitet određuje smanjenjem proizvodnje produkta kroz neko vrijeme. ORAC vrijednosti se uglavnom izražavaju kao ekvivalenti Troloksa (Prior i sur., 2005).

### 3. METODE EKSTRAKCIJE ANTIOKSIDANSA IZ BILJAKA

Ekstrakcija podrazumijeva tehnološku operaciju pri kojoj dolazi do djelomičnog ili potpunog razdvajanja smjese tvari koje nemaju jednaku topivost u različitim otapalima. Provodi se primjenom odgovarajućih otapala iz krutine ili tekućine u kojoj se nalazi željena tvar. Za ekstrakciju vrijedi da je prilikom ekstrakcije čvrstih tvari nužno povećati površinu djelovanja između faza pomoću usitnjavanja i homogenizacije, u sredini treba ubrzati gibanje faza te ukoliko se poveća količina tvari, tada treba produljiti trajanje ekstrakcije.

Prilikom mirovanja dolazi do prijenosa otopljene tvari iz namirnice u otapalo, odnosno odvija se trostupanjski prijenos mase:

1. U otapalu dolazi do otapanja željene komponente;
2. Iz namirnice prelazi smjesa otapala i otopljene tvari na površinu;
3. U volumenu otapala dolazi do raspršivanja otopljene tvari.

Vrijeme koje je potrebno za ekstrakciju ovisi o temperaturi koja se primjenjuje, topljivosti pojedine komponente u otapalu, površini namirnice podvrgnutoj otapalu, volumnom protoku otapala te njegovoj viskoznosti. Kako bi došlo do povećanja brzine ekstrakcije, pogodno je provesti je pri višim temperaturama zbog povećanja brzine samog procesa jer se na taj način ubrzava otapanje komponente te se ubrzava difuzija komponente u otapalu. Ipak, pri temperaturama ekstrakcije višim od 100°C je potrebna opreznost budući da može doći do oštećenja željene tvari ili ekstrakcije nepoželjnih tvari (Režek Jambrak i Drmić, 2010).

Režek Jambrak i sur. (2011) navode kako se za ekstrakciju mogu upotrijebiti različite konvencionalne metode poput:

1. Destilacija: destilacija vodenom parom, izravna destilacija eteričnih ulja te destilacija vodom i parom;
2. Ekstrakcija otapalima, ekstrakcija s uljima, maceracija;
3. Hladno prešanje.

Destilacija je tradicionalna metoda za ekstrakciju bioaktivnih spojeva i eteričnih ulja iz biljaka (Azmir i sur., 2013). Eterična ulja su mirisni hlapljivi spojevi izolirani iz biljaka ili biljnih dijelova čiji je ukupni udio vrlo nizak te rijetko prelazi 1% mase biljke (Bowles, 2003; Aleksić i Knežević,



2014). Postoje tri vrste destilacije: direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom te destilacija vodom i parom (hidrodestilacija). Kod hidrodestilacije se biljnom materijalu dodaje voda u dovoljnoj količini te se dovodi do vrenja, a postoji mogućnost direktnog ubrizgavanja pare u biljni uzorak. Topla voda i para djeluju kao glavni čimbenici koji oslobađaju bioaktivne spojeve biljnog tkiva. Indirektno hlađenje vodom kondenzira mješavinu para vode i ulja te kondenzirana smjesa teče iz kondenzatora u separator, gdje se ulje i bioaktivni spojevi automatski odvajaju od vode. Hidrodestilacija uključuje tri glavna fizikalno - kemijska procesa: hidrodifuziju, hidrolizu i razgradnju toplinom. Pri visokoj temperaturi ekstrakcije mogu se izgubiti neke hlapljive komponente, stoga ovaj nedostatak ograničava upotrebu hidrodestilacije za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013).

Maceracija predstavlja jednostavan način dobivanja eteričnih ulja i bioaktivnih spojeva. Maceracija se sastoji od nekoliko koraka. Najprije se biljni materijal samelje u sitne čestice kako bi se povećala površina za miješanje s otapalom, potom se dodaje odgovarajuće otapalo te se nakon nekog vremena tekućina procijedi. Dobivena tekućina se ostavi neko vrijeme te se filtrira kako bi se odijelila od eventualnih zaostataka (Azmir i sur., 2013).

Među najčešće postupke za pripremu ekstrakata iz biljnih materijala ubraja se ekstrakcija otapalima zbog toga što je učinkovita, jednostavna te ima širok spektar primjene. Vrsta i svojstva komponente koju se ekstrahira utječu na odabir otapala, stoga je prilikom izbora potrebno razmotriti: točku vrenja koja treba biti što niža kako bi olakšala odvajanje otapala od komponente; polarnost; reaktivnost jer ne smije doći do reakcije otapala s ekstraktom, niti se otapalo smije razgrađivati; viskozitet zato što otapalo mora biti niskog viskoziteta; stabilnost otapala na svjetlo, toplinu i kisik; sigurnost za upotrebu; mora biti raspoloživo u dostatnim količinama; što niže cijene te pogodno za ponovnu upotrebu (Režek Jambrak i Drmić, 2010).

Odabir pravog otapala utječe na količinu i vrstu ekstrahiranih spojeva. Za ekstrakciju fenola iz biljnih materijala koriste se otapala poput metanola, etanola, acetona, etil-acetata kao i njihove kombinacije, često s različitim udjelima vode. Konkretno, za metanol se općenito pokazalo da je učinkovitiji u ekstrakciji polifenola manje molekulske mase, dok se flavanoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju vodenim acetonom. Etanol je također dobro otapalo za ekstrakciju polifenola i siguran je za ljudsku upotrebu. U pripremi fenolnih ekstrakata bogatih antocijanima iz biljnih materijala koriste se najčešće metanol ili etanol jer ovaj sustav otapala denaturira stanične

membrane te istovremeno otapa antocijane i stabilizira ih. Da bi se dobio najbolji prinos ekstrakcije antocijana preporuča se upotreba slabih organskih kiselina poput mravlje, octene, limunske, vinske i fosforne kiseline te niske koncentracije jakih kiselina, poput 0,5 - 3,0 % trifluoroctene kiseline i < 1,0 % kloridne kiseline (Jin i Russell, 2010).

Pri proizvodnji biljnih ulja može se vršiti hladno prešanje koje predstavlja postupak koji se provodi na kontinuiranoj pužnoj preši, bez zagrijavanja i korištenja organskih otapala. Ovim načinom proizvodnje ulje zadržava sve važne sastojke poput esencijalnih masnih kiselina, flavonoida, fenola te tokoferola pa se dobiva ulje visoke kvalitete. Nakon hladnog prešanja, dobiveno sirovo ulje se taloži prirodnim putem te se filtrira i sprema u tamne boce (Teh i Birch, 2013). Masne kiseline su ugljikovodični lanci različitih duljina te stupnjeva zasićenosti čija je funkcijska skupina karboksilna. Međusobno se razlikuju po duljini lanca i stupnju zasićenosti te o tim čimbenicima ovise njihova svojstva (Stryer i sur., 2013).

## 4. MIRTA

### 4.1. Botanička i morfološka svojstva mirte

Mirta (*Myrtus communis* L.) je vazdazeleni grm gustih i zbijenih izdanaka visine do 5 metara koja pripada porodici mirte (lat. *Myrtaceae*). Kora mirte je u mladosti crvenkasta, zatim pepeljastosiva i uzdužno se ljušti te ima cjelovite, sjajne i mirisne listove na kratkim peteljka. Mirta ima bijele dvospolne cvjetove te cvate čitavo ljeto, a plod joj je mnogosjemena okrugla bobica veličine graška. Dozrijeva u studenom te su joj sjemenke tvrde, bubrežasta oblika. Njezino je stanište makija ili svijetle i prorijeđene šume alepskog bora i hrasta crnike te je rasprostranjena na Sredozemlju. Ljepoti mirte pridonose krupni, okrugli pupovi boje slonovače, koji su na grančicama s cvjetovima te se bobice, ugodna i slatkasta okusa, mogu jesti svježe, ali se češće konzerviraju u rasolu ili se suše i upotrebljavaju kao začin (Kovačić i sur., 2008).

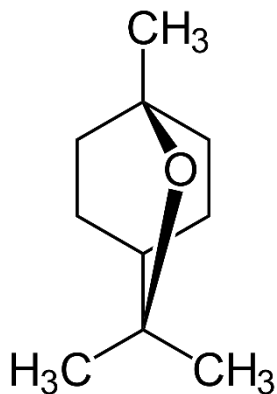
Promatrajući morfološka svojstva poput dimenzija listova, cvjetova i plodova, *Myrtus communis* L. se može podijeliti u dvije podvrste: *Myrtus communis baetica* Mill. i *Myrtus communis italica* Mill. *Myrtus communis baetica* Mill. sadrži tamnoplave plodove, a *Myrtus communis italica* Mill. ima plodove koji ili ostaju bijeli ili se boja promijeni u bljedožutu. Obje podvrste su diploidne te se razlikuju u nekim morfološkim obilježjima poput širine listova, promjera i duljine bobica te broja i mase sjemenki (Messaoud i Boussaid, 2011).



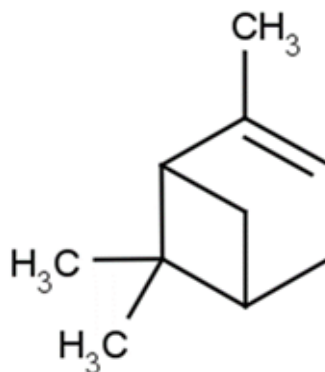
**Slika 4.** Bijele (lijevo) te tamnoplave bobice (desno) *Myrtus communis* L. (Messaoud i Boussaid, 2011)

## 4.2. Kemijski sastav mirte

Glavni sekundarni metaboliti mirte su polifenoli te eterična ulja. Listovi i cvjetovi sadrže eterična ulja, fenolne kiseline (listovi 12 – 15 %, cvjetovi 38 – 40 %) , flavonoide (listovi 8 – 10 %, cvjetovi u tragovima i tanine (listovi 79 – 82 %, cvjetovi 60%), a bobice sadrže tanine ( 53 – 56 %), antocijane (0,2 – 54 %) te masne i organske kiseline (9 – 52 %). Sadržaj ovih spojeva ovisi o promatranom dijelu biljke, ali općenito najčešći spojevi pronađeni su u listovima, stabljikama i cvjetovima mirte su 1,8-cineol (~12 – 34 %) i  $\alpha$ -pinen (~10 – 60 %) (Aleksić i Knežević, 2014).



**Slika 5.** 1,8-cineol (Anonymous 2)



**Slika 6.**  $\alpha$ -pinen (Anonymous 3)

## 4.3. Eterična ulja mirte

Wannes i sur. (2010) kao primjer navode kako sadržaj eteričnog ulja listova, stabljika i cvjetova podvrste *Myrtus communis italica* iznosi 0,61 % ; 0,08 % i 0,30 % (w/w). Eterična ulja su hidrofobna, stoga su u vodi vrlo slabo topiva, a topiva su u alkoholu, nepolarnim i slabo polarnim otapalima, voskovima i uljima. Nalaze se u tekućem agregatnom stanju, većinom su bezbojna ili bljedožuta te imaju nižu gustoću od vode. Kemijski se dobivaju iz terpena te njihovih spojeva s kisikom.

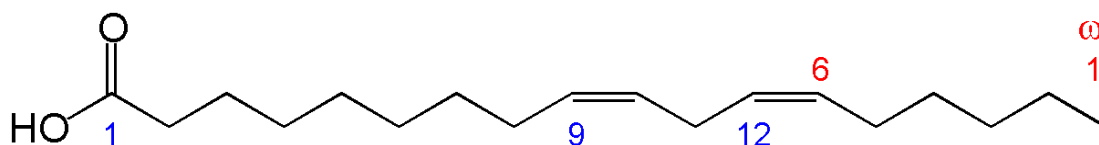
Aleksić i Knežević (2014) navode kako se svi spojevi eteričnih ulja mirte mogu podijeliti u tri glavne skupine: terpene, terpenoide te fenilpropanoide. Terpeni su ugljikovodici, vrsta hlapljivih spojeva od kojih potječe miris biljaka i cvijeća, netopivi su u vodi te se dobivaju kao destilat prilikom zagrijavanja biljnog materijala. Strukturna jedinica zajednička svim terpenima je molekula izoprena ( $C_5H_8$ ), čije su jedinice u molekulama terpena poredane na način „glava – rep”. Najjednostavniji terpeni su monoterpeni ( $C_{10}H_{16}$ ), a oni se sastoje od dvije izoprenske jedinice, terpeni od tri izoprenske jedinice se nazivaju seskviterpeni ( $C_{15}H_{24}$ ), a spojevi s višestrukim  $C_{10}$ -monoterpenskim skeletom su diterpeni, triterpeni i tetraterpeni (Pine, 1987). Primjeri terpena pronađenih u eteričnim uljima mirte su pinen, limonen, sabinen te mircen. Terpenoidi su terpeni koji podliježu biokemijskim promjenama uzrokovanim djelovanjem enzima koji dodaju molekule kisika te dodaju ili odcjepljuju metilne grupe. Primjeri terpenoida u eteričnim uljima mirte su linalool, linalil acetat te geraniol. Fenilpropanoidi čine relativno malen udio eteričnih ulja mirte, a najviše su istraženi eugenol, izoeugenol, vanillin, šafrol i cimetaldehid (Aleksić i Knežević, 2014).

Analizama plinske kromatografije te masene spektrometrije identificirana su 33 sastojka, što predstavlja 92,2 % i 93,0 % ukupnog sastava eteričnog ulja bijelih i tamnoplavih bobica. Eterična ulja bijelih i tamnoplavih bobica su bogata oksigeniranim monoterpenima (69,9 % u tamnoplavim i 78,7 % u bijelim bobicama). Glavni sastojci ulja bijele bobice su mirtenil acetat (20,3 %), 1,8-cineol (18,2 %) i geranil acetat (9,4 %), dok su 1,8-cineol (16,3 %),  $\alpha$ -terpineol (15,7 %), linalool (11,6 %),  $\alpha$ -pinen (11,1 %) i geranil acetat (8,2 %) identificirani kao glavni sastojci ulja tamnoplave bobice (Messaoud i Boussaid, 2011).

#### **4.4. Masne kiseline mirte**

Messaoud i Boussaid (2011) su identificirali 11 masnih kiselina u objema podvrstama mirte. U sjemenkama i perikarpima tamnoplavih te bijelih bobica identificirane su palmitinska kiselina (6,7 – 12,4 %), oleinska kiselina (5,8 – 20,0 %) i linolna kiselina (52,8 – 78,0 %).

Yıldırım i sur. (2015) navode kako su oleinska i linolna kiselina dominantne nezasićene masne kiseline u plodovima mirte te se udio nezasićenih masnih kiselina kreće u rasponu od 81,09 do 83,97 % ukupne masti. Većina nezasićenih masnih kiselina u plodovima mirte su polinezasićene masne kiseline (oko 70 %), a važno je izdvojiti kako su plodovi mirte vrlo bogati linolnom kiselinom, koja je n-6 esencijalna masna kiselina te ju ljudsko tijelo nije sposobno sintetizirati. Važnost linolne kiseline za ljudsko zdravlje je njena moć da stabilizira strukture staničnih membrana i kože (Yıldırım i sur., 2015).



**Slika 7.** Linolna masna kiselina (Anonymous 4)

#### 4.5. Fenolni spojevi mirte i antioksidacijska aktivnost

Tamnoplave bobice mirte sadrže više fenolnih spojeva od bijelih bobica, pri čemu su u bijelim bobicama prevladavajući fenolni spojevi naringin, galna i klorogenska kiselina, a u tamnoplavim bobicama su naringin, galna, kavaska, p-hidroksibenzojeva, ružmarinska i klorogenska kiselina. Ružmarinska i p-hidroksibenzojska kiselina pronađene su samo u tamnoplavim bobicama te ove bobice sadrže kafeinsku kiselinu u većim količinama. Osim bobica, lišće mirte također sadrži visoku razinu fenolnih spojeva i pokazuje antioksidacijsko djelovanje (Yıldırım i sur., 2015).

Prema Messaoud i Boussaid (2011), metanolni ekstrakti tamnoplavih bobica sadrže veće udjele ukupnih fenola (63,2 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g s.t.), flavonoida (25,6 mg ekvivalenta rutina (RE)/g s.t.) i flavonola (3,5 mg ekvivalenta katehina (CE)/g s.t.) od onih iz bijelih bobica (53,0 mg GAE/g s.t., 15,0 mg RE /g s.t. i 1,4 mg CE/g s.t.).

Osim toga, rezultati su pokazali značajne kvantitativne razlike između bobica glede antocijanina, čiji je sadržaj izražen u miligramima ekvivalenta malvidin 3-O glukozida na 100 grama suhe tvari (mg M-3-GE/ 100 g s.t.). Ekstrakti tamnoplavih plodova sadrže veće količine svih identificiranih antocijanina (ukupni sadržaj 625,8 mg M-3-GE/100 g) te je to i bilo očekivano jer obično su više razine polifenola, flavonoida i antocijanina pronađene u tamno ljubičastim, plavim ili crvenim plodovima, nego u blijedim (žutim, bijelim) plodovima.

Oba metanolna ekstrakta bobica pokazala su značajno antioksidacijsko djelovanje, iako su određene razlike u antioksidacijskom potencijalu između plodova opažene u metodama DPPH<sup>•</sup> i FRAP. Najveći redukcijski potencijal DPPH<sup>•</sup> opažen je u metanolnom ekstraktu tamnoplavih plodova, s vrijednosti IC<sub>50</sub><sup>1</sup> od 2,1 mg/ml, dok je primjerice IC<sub>50</sub> vrijednost Troloksa 0,2 mg/ml. Tamnoplavi plodovi također su pokazali veće FRAP vrijednosti (2,7 mmol Fe<sup>2+</sup>/g), dok su bijeli plodovi imali značajno nižu reducirajuću snagu od 2,1 mmol Fe<sup>2+</sup>/g. Navedene varijacije antioksidacijskih sposobnosti između dvaju plodova mirte se mogu pripisati njihovom različitom sadržaju fenola (Messaoud i Boussaid, 2011).

#### **4.6. Ljekovita svojstva mirte**

Mirta je tisućljetni lijek i začim na hrvatskim otocima, njezino se eterično ulje u pučkoj medicini upotrebljava za liječenje raznih bolesti poput bolesti crijeva, mjehura, urinarnih i spolnih organa te plućnih bolesti poput bronhitisa i kašlja. Plodovi mirte se upotrebljavaju za liječenje tegoba sa zubnim mesom, sluznicom usta, grla i jezika. Listove mirte možemo upotrijebiti za zaustavljanje krvarenja, uništavanje bakterija te za aromatiziranje namirnica (Lesinger, 2006).

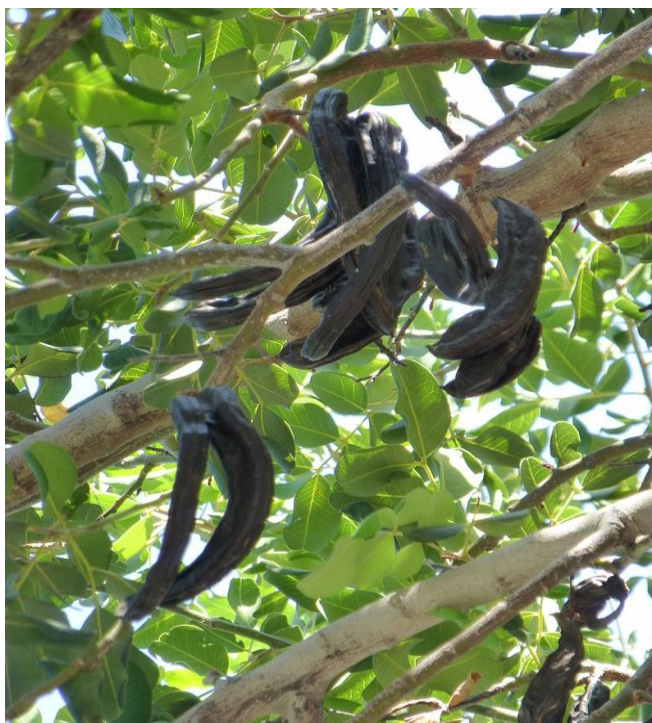
---

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> vrijednost je koncentracija ispitivanog uzorka koja je izračunata kao potrebna za smanjenje boje otopine DPPH za 50% (Papagiannopoulos i sur., 2004).

## 5. ROGAČ

### 5.1. Botanička i morfološka svojstva rogača

Rogač (*Ceratonia siliqua* L.) je vazdazeleno, vrlo razgranato stablo okrugle krošnje ili veći grm, visine 5 – 10m te pripada porodici mahunarki (*lat. Fabaceae*). Kora debla je u mladosti tanka, glatka i pepeljasta, a poslije postane hrapava, crvenkasta ili siva bogata treslovinama. Listovi rogača su parno perasto sastavljeni te su odozgo sjajno tamnozeleni, odozdo modrozelenkasti, a zatim crvenosmeđi. Rogač ima sitne tamnocrvene cvjetove, a plod je plosnata, žilava, kožasta, blago povijena, tvrda, glatka, pomalo sjajna i suha tamnocrveno - smeđa mahuna. Mahuna je dužine 10 - 20 cm i širine 2 - 4 cm, dozrijeva 11 mjeseci, a usplode joj je manjim dijelom mesnato i slatko. U mesnatoj pulpi mahune se nalaze sjemenke koje su sitne i tvrde, sjajne smeđe - crvene boje, a unutar jedne mahune ih je 10 – 15. Rogaču pogoduju vapnenačka tla te je biljka porijeklom iz Palestine i Sirije, a osjetljiv je na niske temperature te oštre i hladne vjetrove. U Hrvatskoj je raširen u srednjoj i južnoj Dalmaciji, a uzgaja se po čitavom svijetu (Kovačić i sur., 2008).



**Slika 8.** Rogač (Anonymous 5)



## 5.2. Kemijski sastav rogača

Plod rogača se sastoji od dva glavna dijela, pulpe koja čini 90% te sjemenki koje čine 10% ploda. Kemijski sastav pulpe ovisi o kultivaru, porijeklu te vremenu berbe (Goulas i sur., 2016).

Rogač je uistinu bogat izvor hranjivih sastojaka s obiljem ugljikovodika, vitamina, minerala i polifenola te ima malene udjele proteina i masnoća. Mahune rogača sa 6,01 % vode sadrže 18,1 - 60% šećera, od kojih su u najvećem udjelu: glukoza (5 – 6 %), fruktoza (5 – 7 %) i saharoza (32 – 38 %), 9,69 – 50 % vlakana, 3 – 4,71 % proteina i 0,23 – 0,8 % lipida (Zannou i sur., 2019). Strikić i sur. (2006) navode kako u mineralnom dijelu rogač sadrži kalij (1100 mg / 100 g), kalcij (307 mg / 100 g), magnezij (42 mg / 100 g), natrij (13 mg / 100 g), željezo (104 mg / 100 g) i druge elemente.

Zrele mahune rogača sadrže i veliku količinu kondenziranih tanina koji čine 16 -20 % suhe mase. Plod rogača je kompleksna mješavina primarnih i sekundarnih metabolita te sadrži vrlo raznolike polifenole, a osim toga brojne aminokiseline su također prisutne u plodovima rogača. Aminokiseline prisutne u plodu rogača su asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, serin, glicin, histidin, arginin, treonin, alanin, tirozin, valin, prolin, metionin, izoleucin, leucin, cistein, fenilalanin i lizin. Asparaginska kiselina, asparagin, alanin, glutaminska kiselina, leucin i valin zajedno čine oko 57 % ukupnog sadržaja aminokiselina u mahunama rogača (Goulas i sur., 2016).

## 5.3. Masne kiseline rogača

Ulje sjemenki rogača sadrži linolnu, oleinsku, palmitinsku i stearinsku masnu kiselinu. U negliceridnoj frakciji sadrži i tokoferole, od kojih osobito  $\gamma$ -tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol i  $\beta$ -tokoferol te sterole, od kojih uglavnom  $\beta$ -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, 7-avenasterol, 7-stigmasterol i klerosterol.

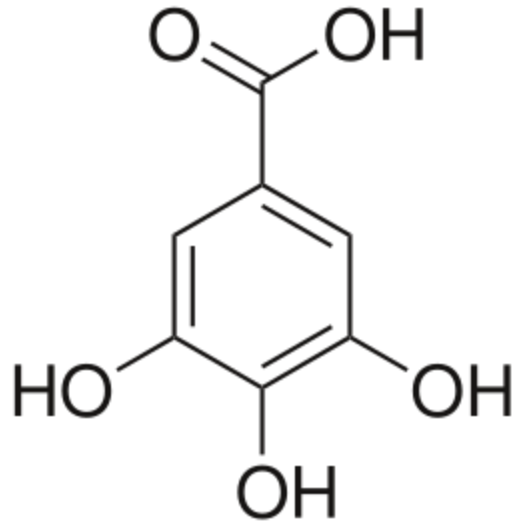
Rogač sadrži i hlapive masne kiseline koje osiguravaju glavninu hlapivih tvari koje uglavnom doprinose ukupnom mirisu rogača. Butanska, octena, izomaslačna, heksanska, maslačna i 2-metilmaslačna kiselina su najvažnije hlapive masne kiseline otkrivene u rogaču (Zannou i sur., 2019).

#### **5.4. Fenolni spojevi rogača i antioksidacijska aktivnost**

Glavne kategorije fenolnih spojeva koje se nalaze u plodu rogača su fenolne kiseline, tanini i flavonoidi. Koncentracija polifenola u plodovima rogača ovisi o genetskim, okolišnim i ekstrakcijskim metodama te se kreće u rasponu između 45 - 5376 mg GAE/100 g. U plodu rogača fenolni spojevi nalaze se kao slobodni, vezani ili u obliku topljivih konjugiranih oblika. Osim toga, klice i sjeme rogača također su bogat izvor fenolnih spojeva. Plod rogača jedan je od najbogatijih izvora galne kiseline te je njezin sadržaj procijenjen između 23,7 mg/100 g i 164,7 mg/100 g (Goulas i sur., 2016).

Prema Zannou i sur. (2019) rogač sadrži velike količine polifenolnih spojeva, posebno tanina za koje je utvrđeno da čine između 18 i 20 % sastava, a osim tanina, utvrđeni su flavonoidi u etil-acetatnim i metanolnim ekstraktima rogačeve kore, koji su pokazali snažno antioksidacijsko djelovanje. U vodenim ekstraktima lišća i mahuna rogača pronađeni su spojevi poput galne kiseline, (-) epigalokatehin-3-galata kao i (-) epikatehin-3-galata. Više od 40 pojedinačnih polifenolnih spojeva identificirano je u rogaču i njegovim nusproduktima, a ti spojevi su galna kiselina, epigalokatehin, prodelfinidin, procijanin, miricetin, kvercetin i kampferol. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) provedena na nezrelim mahunama rogača pokazala je da su glavni fenolni spojevi pirogalol, katehin, galna kiselina, epikatehin, taninska kiselina i kumarin. Uspoređujući ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mahune rogača, pokazalo se da je ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) djelotvornija od ultrazvučnih i konvencionalnih metoda.

Stavrou i sur. (2018.) navode kako za otkrivanje polifenola u rogaču ne postoje standardizirane ekstrakcijske i analitičke metode. Primjerice, udio polifenola u pojedinim ekstraktima može varirati ne samo zbog kultivara i geografskih čimbenika, već i zbog procesa ekstrakcije koji se primjenjuje. Otapalo i temperatura ekstrakcije su jedni od najvažnijih faktora te se pokazalo da su metanol i etil-acetat najučinkovitija otapala, dok vrela voda može dovesti do razgradnje nekih polifenolnih spojeva. Stavrou i sur. (2018.) također navode kako ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) te ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pokazuju najbolje rezultate upravo zbog toga što se ne koriste ekstremni uvjeti, a tekućinska kromatografija (LC) te masena spektroskopija (MS) su se pokazale kao najprikladnije za kvantifikaciju polifenola jer imaju niska ograničenja detekcije i kvantifikacije, a istodobno se mogu dobiti korisne informacije o strukturama složenijih spojeva.



**Slika 9.** Galna kiselina (Anonymous 6)

El Hajaji i sur. (2011) su ispitali ekstrakte kore rogača kako bi utvrdili njihovu antioksidacijsku aktivnost. Otkriveno je da antioksidansi u ekstraktima etil acetata i metanola imaju sposobnost uklanjanja slobodnog radikala DPPH•, pri čemu su metanolni ekstrakti pokazali bolju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u usporedbi s ekstraktima etil acetata. Rezultati DPPH• analiza za metanolne ekstrakte su pokazali da vrijednosti IC<sub>50</sub> variraju između 0,7 g/L do 1,8 g/L, a za etil-acetatne ekstrakte IC<sub>50</sub> iznosi od 1,6 g/L do 2,8 g/L. Prisutnost flavonoida i tanina u biljkama je odgovorna za uočene efekte uklanjanja slobodnih radikala.

### **5.5. Ljekovita svojstva rogača**

Preparati samljevenih sjemenki rogača smatraju se uspješnima u liječenju dišnih i probavnih tegoba te u dijetetici (Kovačić i sur., 2008). Zannou i sur. (2019) navode kako se rogač može koristiti u liječenju astme, bronhitisa, gripe, kašlja, karcinoma, kardiovaskularnih bolesti te proljeva upravo zato što obiluje tisućama fitokemijskih komponenti.

## 6. TRŠLJA

### 6.1. Botanička i morfološka svojstva tršlje

Tršlja (lat. *Pistacia lentiscus* L.) je biljka iz porodice vonjača ili rujeva (lat. *Anacardiaceae*). Vazdazeleni je grm ili nisko drveće visine do 5 metara te ima zelenosivu koru koja starenjem postaje tamnozeleno i puca na sitne ljuske. Kožasti, sjajni listovi su parno perasto sastavljeni. Lica plojke su im tamnozeleno boje, a svjetlozelenih naličja te imaju svojstven miris. Dvodomna je vrsta sitnih tamnocrvenih cvjetova, skupljenih u klasaste cvatove te cvate od ožujka do svibnja. Plodovi su joj sitne, kuglaste koštunice, promjera 2 - 4 mm, slične bobama te su u početku crvenkaste boje, a kad sazriju kasno u jesen, pocrne. Tršlja raste u sastavu makije na sunčanim, stjenovitim staništima eumediteranskog područja, na plitkim i skeletnim tlima te podnosi veliku žegu, sušu, zasjenu i zaslanjena tla. Rasprostranjena je na Sredozemlju, gdje je pogodna za ozelenjavanje staništa uz morsku obalu. Kada se zareže kora tršlje, iz nje curi mirisav smolasti sok zvan mastiks koji se upotrebljava u medicini, industriji i proizvodnji pića (mastika). Iz prokuhanih plodova se dobiva masno ulje, a listovi tršlje su bogati treslovinama (tanini) te se primjenjuju za bojenje tkanina (Kovačić i sur., 2008).



**Slika 10.** Tršlja (Anonymous 7)

## 6.2. Kemijski sastav tršlje

GC - MS analize kemijskog sastava eteričnog ulja smole tršlje pokazuje kako su glavne kategorije kemijskih spojeva monoterpenski ugljikovodici, monoterpeni s kisikom i seskviterpeni. Identificirano je otprilike 69 do 72 sastojka te možemo zaključiti da su  $\alpha$  - pinen (30 – 75 %), mircen (3 – 60 %) i  $\beta$  - pinen (1 – 3 %) glavne komponente koje zajedno čine oko 90 % ulja. Preciznije, monoterpenski ugljikovodici predstavljaju 50 %, monoterpeni s kisikom 20 %, a seskviterpeni 25 % ukupno proizvedenog ulja (Pachi i sur., 2020).

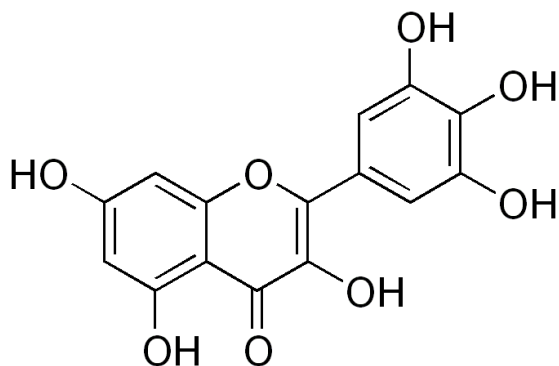
Najvažnija komponenta tršlje je smola. Eterično ulje dobiveno iz lišća sadrži  $\beta$  - kariofilen (31,38 %), germakren (12,05 %) i  $\gamma$ -kadinen (6,48 %) (Nahida i sur., 2012).

Eterično ulje ove biljke sadrži nekoliko glavnih spojeva: mircen (19 – 25 %),  $\alpha$ -pinen (16 %), terpinen-4-ol (22 %),  $\delta$ -3-karen (65 %), limonen,  $\beta$  - pinen,  $\alpha$  - felandren, sabinen, para-cimen i  $\gamma$  - terpinen (Benhammou i sur., 2007).

### 6.3. Fenolni spojevi tršlje i antioksidacijska aktivnost

Benhammou i sur. (2007) su analizirali antioksidacijsko djelovanje na etanolnim ekstraktima lišća tršlje te su identificirali para-kumarinsku kiselinu. Porodicu *Anacardiaceae*, u koju pripada tršlja, karakterizira pojava derivata galne kiseline i miricetina. Tri glavne skupine sekundarnih metabolita koje se pojavljuju kod tršlje su galna kiselina i njeni derivati s glukozom i kvininskom kiselinom; flavonolni glikozidi (miricetin i kvercetin glikozidi) te antocijanini (delfinidin 3-O-glikozid i cijanidin 3-O-glukozid). Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva u lišću se temelji na „čišćenju“ slobodnih radikala, a osim navedenog, prisutnost galne kiseline i njenog derivata, 1, 2, 3, 4, 6-pentagalolilglukoze u plodovima igra zaštitnu ulogu protiv peroksidacije lipida izazvane vodikovim peroksidom. Iz lišća tršlje su izolirane galna kiselina; 5-O-galoil; 3,5-O-digaloil; 3,4,5-O-trigaloil-kvininska kiselina te se smatraju odgovornima za uklanjanje slobodnih radikala poput 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>), superoksidnog aniona (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i hidroksilnog (OH<sup>•</sup>) radikala.

Romani i sur. (2002.) navode kako je u lišću tršlje koncentracija galoilnih derivata izuzetno visoka te predstavlja 5,3 % suhe tvari, a prisutne su i značajne količine derivata miricetina te čine oko 1,5 % suhe tvari lišća. Rezultati HPLC/DAD analize su pokazali kako derivati galoila čine više od 70 %, a derivati miricetina čine više od 20 % ukupne količine polifenola u lišću tršlje. Najzastupljeniji derivati galoila su 3,5-O-digaloil kininska kiselina (26,8 ± 4,67 mg/g s.t.), 5-O-galoil kininska kiselina (9,6 ± 2,25 mg/g s.t.) te 3,4,5-O-trigaloil kininska kiselina (10,3 ± 2,45 mg/g s.t.). Najzastupljeniji derivati miricetina su miricetin glukuronid (3,9 ± 0,65 mg/g s.t.) miricetin 3-O-rutinozid (4,5 ± 0,18 mg/g s.t.) i miricetin 3-O-ramnozid (6,8 ± 1,04 mg/g s.t.). Od derivata kvercetina zastupljen je kvercetin 3-O-ramnozid (3,7 ± 0,52 mg/g s.t.).



**Slika 11.** Miricetin (Anonymous 8)

Nahida i sur. (2012) navode kako su polifenolni spojevi iz lišća galna kiselina i njeni derivati, flavonol glikozid i antocijanini (delfinidin 3-O-glukozid i cijanidin 3-O-glukozid) te da lišće također sadrži i  $\alpha$ -tokoferol.

Remila i sur. (2015) su u svom istraživanju određivali antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lišća i plodova tršlje te rezultati pokazuju da ekstrakti listova sadrže znatno više ukupnih fenola i flavonoida ( $429,58 \pm 3,26$  mg CatE/gE i  $139,38 \pm 3,11$  mg RutE/gE) u odnosu na ekstrakte ploda ( $205,79 \pm 6,51$  mg CatE/gE i  $6,28 \pm 1,04$  mg RutE/gE). Međutim, količina tanina je viša u ekstraktima ploda ( $216,74 \pm 5,31$  mg TAE/gE), nego u listovima ( $142,56 \pm 2,60$  mg TAE/gE). Ekstrakti listova pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost ispitivanu ORAC metodom ( $5865 \pm 406$  mol TE/100gE) u usporedbi s plodovima tršlje ( $3664 \pm 07$  molTE/100gE).

#### **6.4. Masne kiseline tršlje**

Mezni i sur. (2014) su proučavali sastav masnih kiselina ulja ekstrahiranih iz pulpe, sjemenki i cjelovitih plodova tršlje te izvješćuju kako devet analiziranih ulja sadrže istih pet glavnih masnih kiselina sa značajnim razlikama u koncentraciji. Prisutne masne kiseline su oleinska (C18: 1), palmitinska (C16: 0), linolna (C18: 2), stearinska (C18: 0) i palmitoleinska (C16: 1) kiselina te se pokazalo da je oleinska kiselina dominantna u ulju tršlje, a slijede je palmitinska i linoleinska kiselina. Međutim, rezultati ove studije pokazali su da udjeli oleinske, palmitinske i stearinske kiseline imaju značajne varijacije prema tri stupnja zrelosti. Najveća količina oleinske kiseline zabilježena je u ulju izdvojenom iz zrele pulpe (55 %), dok je ulje nezrelog sjemena imalo najviši udjel stearinske kiseline (4 %). Ulje tršlje je relativno bogato palmitinskom kiselinom koja doseže 28 % ukupnih masnih kiselina, u usporedbi s drugim jestivim uljima poput maslinovog ulja u kojem je udio palmitinske kiseline 7,5 – 20 % i suncokretovog ulja u kojem je njezin sadržaj 5 – 6 %.

#### **6.5. Učinci tršlje na zdravlje**

Bobice tršlje su bogate antocijaninima koji imaju antioksidacijske sposobnosti i potiču autofagiju, mehanizam za pojačavanje kemoprotekcije, a smola ove biljke je pokazala protuupalna i antioksidacijska svojstva u bolesnika s Crohnovom bolešću. Listovi se primjenjuju u tradicionalnoj medicini u obliku infuzije za liječenje bolesti kao što su ekcem, proljev i infekcije grla (Rodríguez-Pérez i sur., 2013).

Eterično ulje smole pokazalo se vrlo učinkovito u borbi protiv mikroorganizama i gljivica, dok su ulja iz lišća i grančica pokazala umjereno djelovanje protiv bakterija te su potpuno neučinkovita protiv gljivica (Benhammou i sur., 2007).



## 7. ZAKLJUČAK

- Antioksidansi u normalnim uvjetima u organizmu smanjuju oksidacijski stres, međutim, u uvjetima kada nastupe bolesti, obrana protiv reaktivnih kisikovih vrsta je oslabljena te se povećava oksidacijsko opterećenje, stoga je u takvim uvjetima vanjska opskrba antioksidansima važna za uklanjanje štetnih posljedica oksidacijskog stresa.
- Plodovi mirte mogu biti tamnoplave ili bljedožute bobice koje se međusobno razlikuju u sadržaju polifenola, pri čemu metanolni ekstrakti tamnoplavih bobica sadrže veće količine ukupnih fenola (63,2 mg GAE/G s.t.), flavonoida (25,6 mg RE/g s.t.) te flavonola (3,5 mg CE/g s.t.) u odnosu na bljedožute bobice. Stoga ne iznenađuje podatak kako veći antioksidacijski potencijal imaju upravo tamnoplave bobice, s vrijednostima  $IC_{50} = 2,1$  mg/ml za redukciju DPPH• te s većom FRAP vrijednosti od 2,1 mmol  $Fe^{2+}$ /g u odnosu na bljedožute bobice kod kojih je FRAP vrijednost 2,1 mmol  $Fe^{2+}$ /g.
- Rogač sadrži velike količine polifenolnih spojeva, posebno tanina za koje je utvrđeno da čine između 18 i 20 % sastava, a osim tanina, utvrđeni su flavonoidi u etil-acetatnim i metanolnim ekstraktima rogačeve kore, koji su pokazali snažno antioksidacijsko djelovanje. Metanolni ekstrakti su pokazali bolju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u usporedbi s ekstraktima etil acetata, što potvrđuju rezultati DPPH• analiza. Za metanolne ekstrakte se pokazalo da vrijednosti  $IC_{50}$  variraju između 0,7 g/L do 1,8 g/L, a za etil-acetatne ekstrakte  $IC_{50}$  iznosi od 1,6 g/L do 2,8 g/L.
- U lišću tršlje je koncentracija galoilnih derivata izuzetno visoka te predstavlja 5,3 % suhe tvari, a prisutne su i značajne količine derivata miricetina te čine oko 1,5 % suhe tvari lišća. Ekstrakti listova sadrže znatno više ukupnih fenola i flavonoida ( $429,58 \pm 3,26$  mg CatE/gE i  $139,38 \pm 3,11$  mg RutE/gE) u odnosu na ekstrakte ploda ( $205,79 \pm 6,51$  mg CatE/gE i  $6,28 \pm 1,04$  mg RutE/gE). Međutim, količina tanina je viša u ekstraktima ploda ( $216,74 \pm 5,31$  mg TAE/gE), nego u listovima ( $142,56 \pm 2,60$  mg TAE/gE). Ekstrakti listova pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost ispitivanu ORAC metodom ( $5865 \pm 406$  mol TE/100gE) u usporedbi s plodovima tršlje ( $3664 \pm 07$  mol TE/100gE).

## 8. POPIS LITERATURE

Aleksić V., Knežević P. (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research* **169**: 240 - 254

Anonymous 1 (2014) < <https://www.dojindo.com/DPPH-Antioxidant-Assay-Kit> >. Pristupljeno 19. svibnja 2020.

Anonymous 2 (2009) < <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,8-Cineol.svg> >. Pristupljeno 4. svibnja 2020.

Anonymous 3, <<https://cymitquimica.com/products/TM-TL0003/2437-95-8/alpha-pinene/>>. Pristupljeno 4. svibnja 2020.

Anonymous 4 (2006) < [https://www.wikiwand.com/sh/Linolna\\_kiselina](https://www.wikiwand.com/sh/Linolna_kiselina) >. Pristupljeno 5. svibnja 2020.

Anonymous 5 (2013) < [https://en.wikipedia.org/wiki/Carob#/media/File:Ceratonia\\_siliqua\\_Keciboynuzu\\_1370984\\_Nevit.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Carob#/media/File:Ceratonia_siliqua_Keciboynuzu_1370984_Nevit.jpg) >. Pristupljeno 26. svibnja 2020.

Anonymous 6 (2008) < [https://www.wikiwand.com/sh/Galna\\_kiselina](https://www.wikiwand.com/sh/Galna_kiselina) >. Pristupljeno 8. svibnja 2020.

Anonymous 7 (2018) < <https://mavcure.com/rumi-mastagi-health-benefits/> >. Pristupljeno 26. svibnja 2020.

Anonymous 8 (2007) < <https://sh.wikipedia.org/wiki/Miricetin> >. Pristupljeno 25. svibnja 2020.

Antolovich M., Prenzler P., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *The analyst* **127**: 183 - 198.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena, F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**: 426 - 436.

- Benhammou N., Bekkara Atik F., Kadifkova Panovska T. (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African journal of pharmacy and pharmacology* **2**, 22 - 28.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2013) Biokemija, 6. izd., Školska knjiga. str. 327 - 328.
- Bowles E. J. (2003) The chemistry of aromatherapeutic oils, 3. izd., Griffin Press. str 1 – 236.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition reviews* **56**: 317 – 333.
- El Hajaji H., Lachkar N., Alaoui K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili, A., El Bali B., Lachkar, M. (2011) Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* **4**: 321 - 324.
- Generalić I. (2011) Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja. Disertacija, Prehrambeno – biotehnološki fakultet
- Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M. V., Mavromoustakos T., Tzakos A. G. (2016) Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *International journal of molecular sciences* **17**: 1 – 20.
- Jin D., Russell J. M. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**: 7313 - 7352.
- Kazazić S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279 – 290.
- Kesić A., Ibrišimović-Mehmedinović N., Šestan A. (2015) Phytochemical Profile of Honey. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. 99 – 109.
- Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jasprica N., Bogdanović S., Topić J. (2008) Flora jadranske obale i otoka - 250 najčešćih vrsta, 1. izd., Školska knjiga. str. 58 – 59; 108 – 109; 118 – 119
- Lesinger I. (2006) Liječenje začinskim biljem (L – Ž), 10. izd., Izdavačka kuća Adamić. str. 261 – 265.

- Messaoud C., Boussaid M. (2011) Myrtus communis berry color morphs: a comparative analysis of essential oils, fatty acids, phenolic compounds, and antioxidant activities. *Chemistry & biodiversity* **8**: 300 – 310.
- Mezni F., Labidi A., Msallem M., Boussaid M., Khoudja M., Khaldi A. (2014) Influence of harvest date on fatty acid composition and antioxidant activity of Pistacia lentiscus L. edible oils. *Journal of materials and environmental science* **5**: 1703 – 1708.
- Nahida, Ansari S., Siddiqui A. (2012) Pistacia Lentiscus: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 16 – 20.
- Pachi V.K., Mikropoulou E.V., Gkiouvetidis P., Siafakas K., Angelis A., Mitakou S., Argyropoulou A., Halabalaki M. (2020) Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (Pistacia lentiscus var. Chia, Anacardiaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 1 – 83.
- Papagiannopoulos M., Wollseifen H., Mellenthin A., Haber B., Galensa, R. (2004) Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (Ceratonia siliqua L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3784 – 3791.
- Pine S. H. (1987) Organska kemija, 5.izd., Školska knjiga. str. 866 – 868., 910 - 913.
- Prior R., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290–4302.
- Rastija V., Medić-Šarić M. (2009) Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji* **51**: 121 – 128.
- Remila S., Atmani-Kilani D., Delemasure S., Connat J.-L., Azib L., Richard T., Atmani D. (2015) Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of Pistacia lentiscus (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine* **7**: 274 - 286.
- Režek Jambrak A., Drmić H. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2**: 22 – 33.

- Režek Jambrak A., Blekić M., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3**: 32 – 47.
- Rodríguez-Pérez C., Quirantes-Piné R., Amessis-Ouchemoukh N., Madani K., Segura-Carretero A., Fernández-Gutierrez A. (2013) A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from Pistacia lentiscus leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **77**: 167 – 174.
- Romani A., Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Tattini M. (2002) Identification and Quantification of Galloyl Derivatives, Flavonoid Glycosides and Anthocyanins in Leaves of Pistacia lentiscus L. *Phytochemical analysis* **13**: 79 – 86.
- Siraki A., Klotz L., Kehler J. (2018). Free Radicals and Reactive Oxygen Species, 3.izd., McQueen C. A., ur., Elsevier, Inc. str. 268.
- Stavrou I., Christou A., Kapnissi-Christodoulou C. (2018) Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects and health impact. *Food chemistry* **269**: 28 – 30.
- Strikić F., Čmelik Z., Perica S. (2006) Morfološke osobine dva perspektivna tipa rogača (Ceratonja siliqua L.) s otoka Visa. *Pomologija Croatica* **12**: 245 – 253.
- Teh S.-S., Birch E. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* **30**: 26 – 31.
- Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. (2012) Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, 155 – 180.
- Wannes W. A., Mhamdi B., Sriti J., Jemia M. B., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M.E., Marzouk B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 1362 – 1370.
- Yıldırım F., Polat M., Yıldırım A., Şan B. (2015) Chemical compositions of myrtle (Myrtus communis L.) genotypes having bluish-black and yellowish-white fruits. *Erwerbs-Obstbau* **57**: 203 – 210.

Zannou O., Guclu G., Koca I., Selli S. (2019) Carob beans (*Ceratonia siliqua* L.): uses, health benefits, bioactive and aroma compounds. *Turkish Journal of Scientific Reviews* **12**: 26 – 34.

### 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.

Iva Škarica

ime i prezime studenta