

# Utjecaj ekstrakcije mikrovalnim zračenjem na koncentraciju karotenoida iz origana

---

Jakoliš, Niko

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:159:639296>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Niko Jakoliš**

7437/PT

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE  
MIKROVALNIM ZRAČENJEM  
NA KONCENTRACIJU  
KAROTENOIDA IZ ORIGANA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Fizikalna kemija

**Mentor:** Doc. dr. sc. Filip Šupljika

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**Utjecaj ekstrakcije mikrovalnim zračenjem na koncentraciju karotenoida iz origana**

***Niko Jakoliš, 0058210936***

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem (MAE) na masenu koncentraciju ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u ekstraktima lišća origana. Ekstrakcija je provedena s 90 % vodenom otopinom metanola pri temperaturama od 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C te vremenu tretiranja od 3, 6 i 9 minuta. Masena koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u ekstraktima lišća utvrđena je primjenom UV/VIS spektroskopije. Kao optimalni uvjeti za izolaciju pigmenata karotenoida iz listova origana primjenom MAE dobiveni su parametri: temperatura (50 °C) te vrijeme tretiranja (9 minuta) .

**Ključne riječi:** ekstrakcija, karotenoidi, mikrovalno zračenje, origano, pigmenti

**Rad sadrži:** 31 stranica, 20 slika, 1 tablica, 51 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Filip Šupljika

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Mojca Čakić Semenčić

**Datum obrane: 10.07.2020.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

**The effect of microwave-assisted extraction on the concentration of carotenoids  
in the oregano leaves**

***Niko Jakoliš, 0058210936***

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the influence of microwave-assisted extraction (MAE) to the mass concentration of total carotenoids, carotens and xantophylls in extracts of oregano leaves. Extraction was carried out with 90% aqueous methanol solution at extraction temperatures of 35 °C, 40 °C, 45 °C and 50 °C. Extraction time was 3, 6 and 9 minutes. The mass concentration of total carotenoids, carotens and xantophylls in leaves extracts was determined by UV/VIS spectroscopy. The optimum conditions for the isolation of carotenoids from oregano leaves using MAE are the extraction temperature of 50 °C and extraction time of 9 minutes.

**Keywords:** extraction, carotenoids, microwaves, oregano, pigments

**Thesis contains:** 31 pages, 20 figures, 1 tables, 51 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Filip Šupljika PhD, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Mojca Čakić Semenčić PhD, Assistant Professor

**Defence date:** July 10<sup>th</sup> 2020

1. Uvod .....	1
2. Teorijski dio .....	2
2.1. Origano .....	2
2.1.1. Taksonomija.....	2
2.1.2. Morfologija.....	4
2.1.3. Stanište i rasprostanjenost .....	4
2.1.4. Agroekološki uvjeti.....	5
2.1.5. Uporaba origana.....	5
2.1.6. Kemijska analiza .....	5
2.1.7. Nutritivna vrijednost origana.....	6
2.1.8. Medicinska analiza .....	7
2.2. Karotenoidi.....	8
2.2.1. Kemijska struktura karotenoida.....	8
2.2.2. Klasifikacija karotenoida .....	9
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost.....	11
2.2.4. Kooperativno djelovanje karotenoida s ostalim antioksidansima .....	12
2.2.5. Zdravstveni učinak.....	12
2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem .....	13
2.3.1. Otapalo.....	15
2.3.2. Temperatura i tlak .....	15
2.3.3. Vrijeme.....	15
2.3.4. Snaga.....	16
3. Materijali i metode.....	17
3.1. Biljni materijal .....	17
3.2. Kemikalije.....	17
3.3. Aparatura i pribor .....	17
3.4. Priprema uzorka .....	18
3.5. Primjena mikrovalnog zračenja .....	18

3.6. Određivanje ukupne koncentracije karotenoida pomoću UV/VIS spektroskopije.....	20
4. Rezultati i rasprava .....	24
5. Zaključak .....	26
6. Popis literature .....	27

## 1. Uvod

Karotenoidi su biljni pigmenti narančasto-žute boje koji se nalaze u nadzemnim dijelovima biljaka, kako u lišću tako i u plodovima. Uz to što djeluju atraktivno te daju biljci na vidljivosti, karotenoidi posjeduju biološku ulogu te su jedni od poznatijih antioksidanasa, štite organizam od raznih oboljenja i imaju izraženo antikancerogeno djelovanje (Rao i Rao, 2007).

Origano je mediteranska, začinska i ljekovita biljka koja se u prehrani upotrebljava od pamtivjeka, a također su poznata i njena blagotvorna svojstva na ljudski organizam kao što su antikancerogena, antioksidacijska i antifungalna svojstva (Kintzios, 2012 ).

Prilikom prerade biljnog materijala dolazi do degradacije pigmenta pa tako i karotenoida. Taj negativan učinak nastoji se smanjiti primjenom „zelenih“ metoda čime se smanjuje degradacija pigmenta, ali i uporaba organskih otapala i energije. Upravo zbog toga se i primjenjuje ekstrakcija mikrovalnim zračenjem (MAE) koja ubrzava sam proces ekstrakcije što dovodi do smanjene uporabe otapala .

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj MAE na masenu koncentraciju ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u listovima origana.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Origano

Origano (*Origanum vulgare* L., Slika 1-2) je višegodišnja, zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Dolazi od grčkih riječi *oros* što znači planina te *gamos* što znači ukras (Kintzios, 2012). Origano je ljekovita, aromatična i medonosna biljka koja se stoljećima uzgaja na području Mediterana. Danas se origano može pronaći na svim kontinentima (Singletary, 2010).



Slika 1. Origano (*Origanum vulgare* L.) (Anonymous 1, 2020 )



Slika 2. Slikovni prikaz origana (*Origanum vulgare* L.) (Singletary, 2010)



### 2.1.1. Taksonomija

Carstvo: *Plantae*

Odjeljak: *Magnoliophyta*

Koljeno: *Magnoliopsida*

Red: *Lamiales*

Porodica: *Lamiaceae*

Rod: *Origanum*

Vrsta: *Origanum vulgare L.*

Tijekom zadnjih 150 godina više od 300 znanstvenih naziva uvedeno je za 70 priznatih vrsta, podvrsta, varijeteta i hibrida origana. Ietswaart je 1980. godine odredio 3 skupine, 10 razreda, 38 vrsta, 6 podvrsta i 17 hibrida. Od tada su priznati 5 novih vrsta i 1 hibrid, čime se broj vrsta popeo na 43, a broj hibrida na 18. Ietswaartove 3 grupe klasificirane su po cvijetu kao:

Grupa A (jednousni ili dvousni cvijet, veće čaške duljine 4-12 mm),

Grupa B (jednousni ili dvousni cvijet, češće manje čaške duljine 1,3-3,5 mm) te

Grupa C (sadrži čašku s 5 jednolikih zubaca).

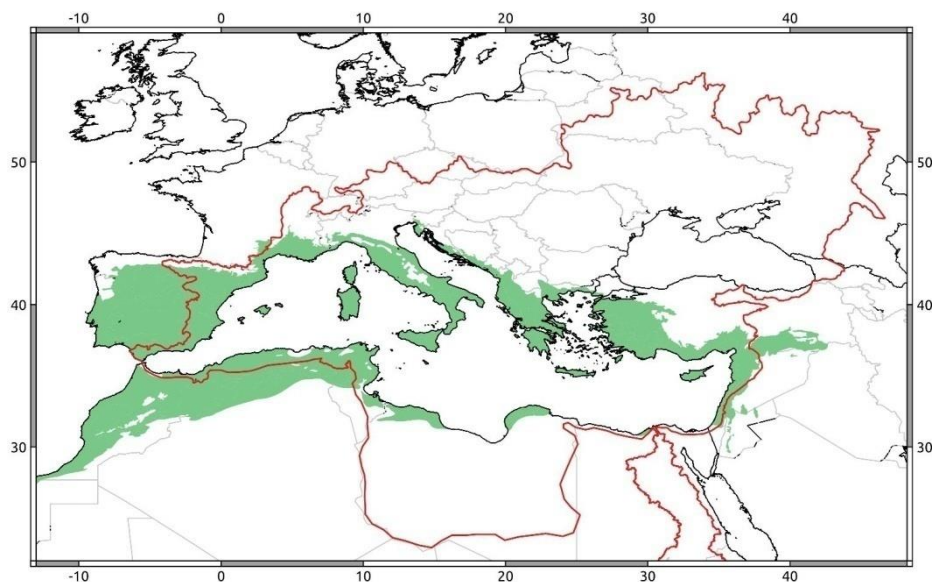
Članovi roda uglavnom su rasprostranjeni u mediteranskom podneblju. 35 roda od ukupno 43 roda nalaze se u istočnom Mediteranu, a 4 vrste isključivo obitavaju samo na području zapadnog Mediterana, dok su 3 vrste endemske i nalaze se na području Libije (Greuter i sur., 1986). Pojedini hibridi nađeni su i na područjima gdje obitava više vrsta origana zajedno, bilo da su prirodno nastanjene ili umjetno prenesene (Kintzios, 2012).

### 2.1.2. Morfologija

Prema morfološkim karakteristikama origano ima većinom uspravne, razgranate stabljike koje su na donjem dijelu odrvenjele (Slika 1, Slika 2). Raste do 80 cm visine. Rizom je horizontalan. Listovi su jednostavni i mali, dugi 1-4 cm te široki 1-2 cm, zašiljeni, smješteni na kratkim peteljka uz nasuprotni razmještaj. Cvjetovi su dvospolni i sakupljeni u metličaste cvatove. Čaška cvijeta je ljevkaasta, a vjenčić zvonast, nježno ružičastog obojenja iz kojega vire prašnici. Cvate od lipnja do rujna. Plodovi su glatki veličine 1 mm. Ističe se snažnim, intenzivnim mirisom zbog visokog sadržaja eteričnih ulja, posebno timola (Kintzios, 2012).

### 2.1.3. Stanište i rasprostranjenost

Kao višegodišnja biljka, origano spontano raste na području južne Europe i dijelovima Azije te kao takva pripada kulturi toplog podneblja. Najzastupljenija u području Mediterana, osobito u Grčkoj, Italiji te Izraelu (Slika 3). Postoji više vrsta i podvrsta origana koje su alohtono rasprostranjene na svim kontinentima, izuzev Antarktike. Staništa su mu sunčana i/ili polusjenovita područja, suhe livade, šume i šikare do 1800 m nadmorske visine (Kintzios, 2012).



Slika 3. Geografska rasprostranjenost (zeleno) origana (*Origanum vulgare* L.) na Mediteranu (Pausas i Millán, 2019)

#### 2.1.4. Agroekološki uvjeti

Origano se razmnožava sjemenom. Dobro podnosi sušu i hladnoću. Tijekom zime nadzemni dijelovi biljke otpadaju, dok korijen ostaje netaknut i vitalan te je ključan za regeneraciju biljke tijekom proljeća. Pedološki je vrlo nezahtjevan. Raste na rahlim, srednje kvalitetnim tlima čiji je pH 4,9-8,7 te u područjima visoke nadmorske visine s hladnim ljetima (Makri, 2002). Ne odgovara mu prevelika količina vlage u tlu, a pogoduje mu optimalna godišnja količina padalina od 500-2700 mm. Prilagođen je toplijim podnebljima, stoga ima velike zahtjeve prema toplini i svjetlosti. Zabilježen opseg rasta je pri temperaturama 6-28 °C (Kintzios, 2012).

#### 2.1.5. Uporaba origana

*Origanum vulgare* općenito je najprodavanija vrsta origana korištena kao začim u Europi, SAD-u te diljem svijeta. Origano kao takav je danas najkomercijalniji začim, čime premašuje 10 000 tona svjetske godišnje proizvodnje (Singletary, 2010). Glavni proizvođač origana je Turska (2/3 ukupne svjetske proizvodnje), zatim slijede Meksiko te Grčka, čiji se origano smatra najkvalitetnijim.

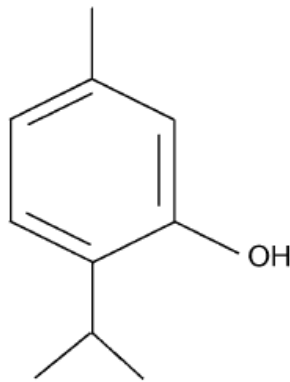
Trgovina organom seže još od antičkih vremena. Hansson i Foley su 2008. otkrili DNA origana na dvije 2400 godina stare amfore, koje su izronjene s dna mora pokraj grčkog otoka Chiosa u Egejskom moru.

Origano se koristi kod mesa, kobasica, salata, variva, umaka te juha. Prehrambena industrija koristi ulja i smole origana u hrani i pićima, a primjenu je našao i u kozmetičkoj industriji. Ulje origana se primjenjuje u alkoholnim pićima, pekarskim proizvodima, mesu i mesnim prerađevinama, začimima, slasticama, mliječnim proizvodima, procesiranom povrću, grickalicama te u uljima i mastima. U popularnoj kulturi najčešći je začim za pizu (Kintzios, 2012).

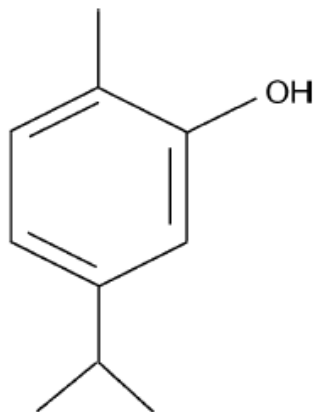
#### 2.1.6. Kemijska analiza

Iako je velik broj kemijskih spojeva već izoliran iz origana (poput flavonoida, aldehida i ketona), najvažnija grupa spojeva (gledano s komercijalne strane) su terpenoidi. Sve vrste origana su

bogate fenolnim monoterpenima npr. karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol, Slika 4) i timol (2-izopropil-5-metilfenol, Slika 5) (Kintzios, 2012).



Slika 4. Kemijska struktura karvakrola (Kintzios, 2012)



Slika 5. Kemijska struktura timola (Kintzios, 2012 )

### 2.1.7. Nutritivna vrijednost origana

Nutritivna vrijednost origana je visoka. Sadrži značajne količine vitamina E, B6, riboflavina, niacina, folne kiseline, pantotenske kiseline i biotina (Holland i sur.,1991). Utvrđene su relativno visoke koncentracije (izražene kao mg/100 g svježeg lišća) vitamina C (45 mg), tiamina (0,07 mg) i karotenoida (0,81 mg). Origano je bogat mineralima kao što su K, Ca, Mg, P, Zn, Mn, Fe, Cu, S, Cl, I, Se dok je koncentracija Na niska. Origano ima relativno skroman energetske iznos (66 kcal/100 g) i udio masti (2 g/100 g) (Kintzios, 2012).

### 2.1.8. Medicinska analiza

Izrazito velika uporaba origana je europskoj kulturi. Europljani origano koriste kao sredstvo protiv nadimanja, antidiuretik, ekspektorans, sredstvo za poboljšanje cirkulacije te kao tonik. Dodatno, u narodnoj medicini korišten je kao sredstvo protiv želučanih tegoba, prehlade, glavobolje, zubobolje i neredovitog menstrualnog ciklusa.

Razne znanstvene studije potvrđuju prednosti origana te se koristi kao terapija za razne bolesti respiratornog trakta (ekspektorans, spazmolitik), gastrointestinalnog trakta (koleretik, digestiv, eupeptik, spazmolitik), urinarnog trakta (diuretik, antiseptik) kao oralni antiseptik te u dermalnoj topikalnoj primjeni (Kintzios, 2012).

Ekstrakti origana imaju dokazana antioksidacijska i antimikrobna svojstva, što se pripisuje fenilkarboksilnim kiselinama kao što su cineminska, kafeinska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, protokatehinska i vanilinska kiselina (Dorofeev i sur., 1989 ; Mirovich i sur., 1989; Deighton i sur., 1993). Smatra se kako fenolni spojevi imaju najjači antimikrobni potencijal (antifungalni i antibakterijski potencijal) (Bullerman i sur., 1977; Hitokoto i sur., 1980; Hussein, 1990; Davv i sur., 1994; Charai i sur., 1996). Primjerice, mljeveni origano (2% konc.) dokazano ima snažan antifungalni potencijal protiv raznih plijesni koje su uzročnici kvarenja hrane, kao što su *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus* (Azzouz i Bullerman, 1982; Schmitz i sur., 1993). Fenolni derivati koji su sadržani u esencijalnim uljima origana mogu također biti uključeni u inhibiciju sporulacije kvasaca tako što potiču potrošnju stanične energije kvasaca (Baricevic i Bartol, 2002). Postoje dokazi da kad je udio karvakrola i timola veći od 100 ppm dolazi do potpune inhibicije fungalnog rasta *in vitro* (Curtis i sur., 1996). Također, postoje istraživanja koja su utvrdila da ekstrakti origana imaju inhibicijski efekt na razne gram negativne (*Proteus vulgaris* i *Escherichia coli*) i gram pozitivne (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*) bakterije, a ova svojstva se najčešće pripisuju upravo karvakrolu i timolu (Biondi i sur., 1993; Izzo i sur., 1995; Shekarforoush i sur., 2007).

## 2.2. Karotenoidi

Karotenoidi su prirodni pigmenti koji se nalaze u kloroplastu i kromoplastu raznih biljaka (Slika 6), nekih vrsta alga, gljiva te bakterija koje imaju sposobnost fotosinteze. Kvaliteta voća i povrća određena je upravo karotenoidima (Van der Berg i sur., 2000). Žuto-narančasta boja voća i povrća potječe od  $\beta$ -karotena (Slika 7) i  $\alpha$ -karotena (Slika 8). Narančasto voće sadrži  $\alpha$ -kriptoksantin. Rajčica posjeduje visok udio likopena (naročito u vanjskoj opni). Tamnozeleno povrće sadrži lutein i zeaksantin. Izolirano i okarakterizirano je više od 600 vrsta karotenoida (Namitha i Negi, 2010).  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein i likopen čine 90% ukupnih karotenoida u čovjekovoj prehrani (Gerster, 1997). Karotenoidi iz voća i povrća čine ključnu ulogu u prevenciji raznih humanih bolesti, uključujući razne tumore, kardiovaskularne bolesti, očne bolesti (katarakta, degeneracija očne makule) te foto inducirane bolesti kože (Rao i Rao, 2007).

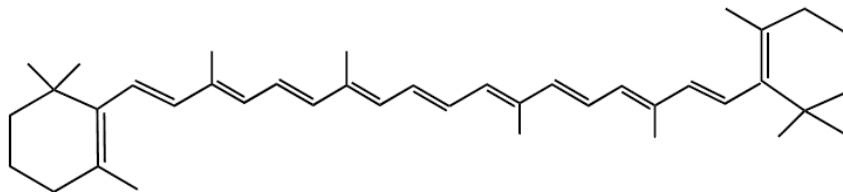


Slika 6. Voće i povrće bogato karotenoidima (Szalay, 2015)

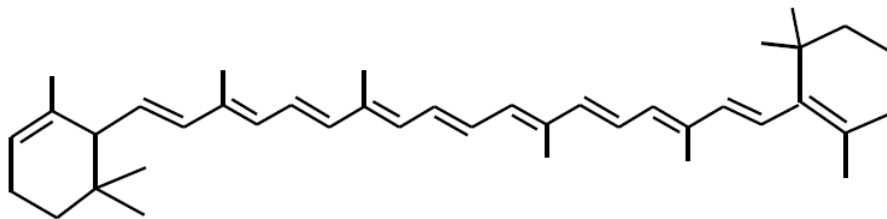
### 2.2.1. Kemijska struktura karotenoida

Karotenoidi su lipofilni tetraterpenoidi (imaju 8 izoprenskih molekula) koji sadrže 40 atoma ugljika u svojoj strukturi povezanih dvostrukim konjugiranim vezama (Britton, 1995). Prirodni karotenoidi dolaze u *trans* obliku, međutim tijekom procesiranja te primjenom topline i

svjetlosti može doći do izomerizacije u *cis* oblik (Rao i Rao,2007). Većina karotenoida sadrži centralni ugljikov lanac s naizmjeničnim jednostrukim i dvostrukim vezama, a uz to sadrže i nesimetrične cikličke i acikličke skupine na krajevima lanca. S povećanjem broja dvostrukih veza, elektroni uključeni u konjugiranu vezu dobivaju više prostora za kretanje što utječe na njihovo pobuđeno stanje te sniženje energije.



Slika 7. Kemijska struktura  $\beta$ -karotena (Rao i Rao, 2007)

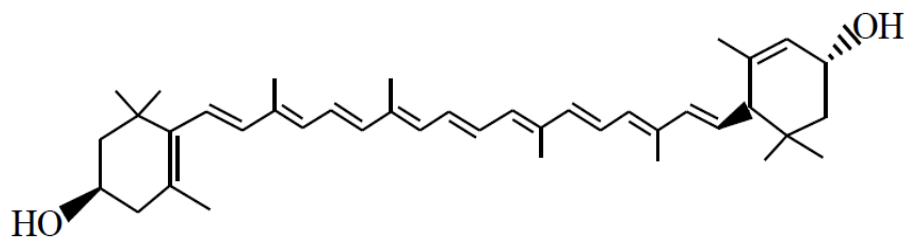


Slika 8. Kemijska struktura  $\alpha$ -karotena (Fraser i Bramley, 2004)

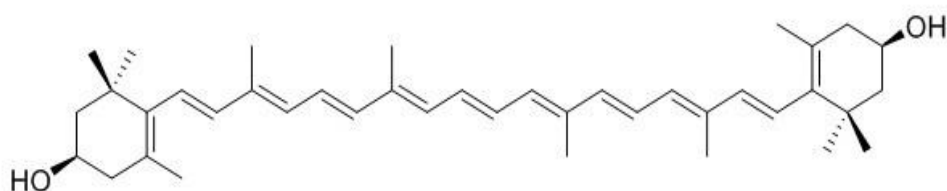
### 2.2.2. Klasifikacija karotenoida

Do danas je otkriveno više od 600 vrsta karotenoida koji se mogu podijeliti u 2 grupe – ksantofile, koji sadrže kisik i karotene, koji ne sadrže kisik. Ksantofili su karotenoidi koji sadrže kisik, sintetiziraju se u plastidima te se kromatografskim metodama mogu odvojiti od karotena zbog razlike u polarnosti funkcionalnih skupina.

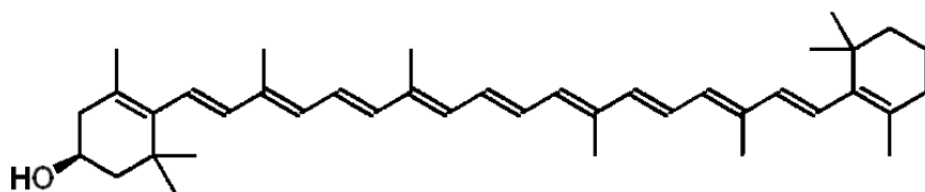
Neki poznatiji ksantofili su lutein (Slika 9), zeaksantin (Slika 10) i  $\beta$ -kriptoksantin (Slika 11).



Slika 9. Kemijska struktura luteina (Rao i Rao, 2007)



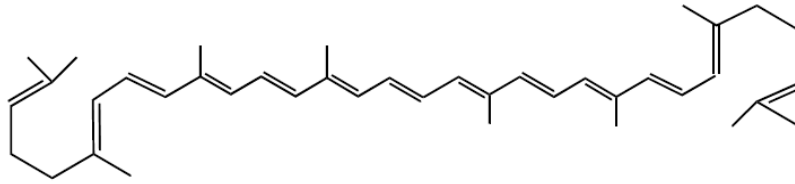
Slika 10. Kemijska struktura zeaksantina (Kostić, 1980)



Slika 11. Kemijska struktura  $\beta$ -kriptoksantina (Rao i Rao, 2007)

Karoteni su spojevi koji sadrže samo ugljik i vodik te nikad ne sadrže kisik. Neki poznatiji karoteni su  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten te likopen (Slika 12). Karoteni su narančasti fotosintetski pigmenti važni za proces fotosinteze i to tako što transmitiraju svjetlosnu energiju apsorbiranu od strane klorofila. Također, štite i tkiva apsorbirajući energiju singletnog kisika (Britton, 1995).





Slika 12. Kemijska struktura likopena (Rao i Rao, 2007)

### 2.2.3. Antioksidacijska aktivnost

Kao karakteristika aerobnog načina života, čovjekov organizam je izložen raznim prooksidansima koji imaju sposobnost narušiti biološku sposobnost važnih molekula kao što su DNA, RNA, proteini, ugljikohidrati i masti (Sies, 1986; Halliwell, 1996). Među raznim obrambenim strategijama, karotenoidi su najvjerojatnije uključeni u stabilizaciju dviju reaktivnih molekula kao što su singletna molekula kisika i peroksidni radikal. Karotenoidi su uključeni i u deaktivaciju molekula koje senzibiliziraju nastajanje slobodnih radikala donirajući im elektrone (Truscott, 1990; Young i Lowe, 2001). Interakcija između karotenoida i singletne molekule kisika ovisi o fizikalnom kontaktu koji uključuje direktan prijenos energije s jedne na drugu molekulu. Energija singletnog kisika prenosi se na molekulu karotenoida nastajanjem stabilne molekule kisika, pri čemu molekula karotenoida prelazi u pobuđeno energetska stanje. Karotenoidi se vraćaju u osnovno energetska stanje tako što predaju energiju okolnom mediju, odnosno otapalu. Među raznim radikalima koji mogu nastati tijekom oksidacije (oksidacijskog stresa) u organizmu, karotenoidi najefikasnije djeluju na peroksidni radikal. Peroksidi nastaju u procesu lipidne peroksidacije i ako se ne prekine njihovo djelovanje mogu uzrokovati oštećenja na lipofilnim dijelovima stanica, kao što su membrane. Upravo zbog svoje lipofilnosti i učinkovitog uklanjanja peroksidnog radikala, karotenoidi zauzimaju važnu ulogu u zaštiti staničnih membrana i lipoproteina od oksidacijskog stresa (Sies i Stahl, 1995).

#### 2.2.4. Kooperativno djelovanje karotenoida s ostalim antioksidansima

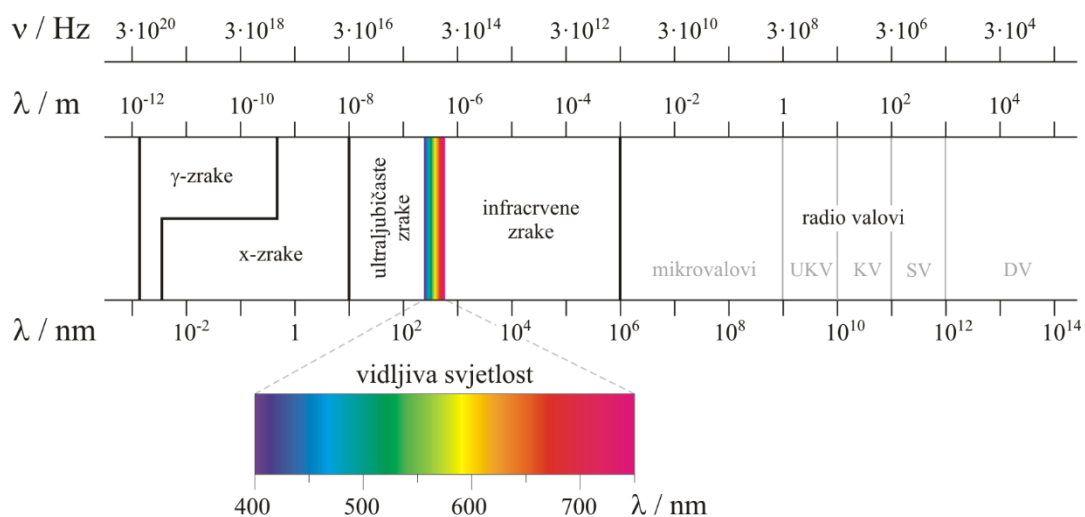
Postoje dokazi iz *in vitro* istraživanja da  $\beta$ -karoten regenerira tokoferole iz radikala tokoferola. Također, postoje dokazi da  $\beta$ -karoten može regenerirati i vitamin C. Vidljiv je i sinergistički učinak protiv UVA zraka koje uzrokuju fotooksidacijski stres u staničnoj kulturi ljudskog fibroblasta. Postoji i kooperativni učinak  $\beta$ -karotena i  $\alpha$ -tokoferola zbog lipofilnog karaktera oba antioksidansa, čime se ostvaruje veći učinak inhibicije lipidne peroksidacije u sinergiji, nego kod svakog antioksidansa zasebno (Rao i Rao, 2007).

#### 2.2.5. Zdravstveni učinak

Osim antioksidativnog, karotenoidi imaju i antikancerogeno djelovanje. Likopen djeluje supresivno na rast tumorskih stanica *in vivo* i *in vitro* te smanjuje rizik od raka prostate (Johnson i Mayer, 2016).  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin ubrajaju se u karotenoide s provitaminskom aktivnošću, a nazivaju se još i provitamini A jer služe kao prekursori za sintezu vitamina A (retinola). Retinol ili biološki aktivna forma retinoična kiselina utječe na održavanje funkcije vida, normalan rast i razvoj te modulaciju imunološkog odgovora. U funkciji vida ulogu još imaju lutein i zeaksantin, pigmenti smješteni unutar makule, centralnog dijela retine oka. Već duže vrijeme je poznata njihova uloga u sprječavanju makularne degeneracije te potencijalno i drugih bolesti oka poput katarakte, dijabetičke retinopatije ili retinopatije nedonoščadi (Eisenhauer, 2017). Apsorbirajući plavo svjetlo i time smanjujući količinu svjetlosti manje valne duljine koja dopire do kritičnih dijelova oka, štite od oksidativnih oštećenja u vanjskim fotoreceptorima (Rao i Rao, 2007).

## 2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem

Upotreba dielektričnog zagrijavanja u znanstvenim ustanovama i laboratorijima, pomoću mikrovalova, započela je kasnih 70-tih godina 20. stoljeća, te je prvu primjenu imala u prehrambenoj industriji. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje (Eskilsson i Bjourklund, 2000). Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva međusobno okomita oscilirajuća polja: električnog i magnetnog polja. Frekvencija mikrovalnog zračenja je između 300 MHz i 300 GHz, a valna duljina je od 1mm do 1m (Slika 13).



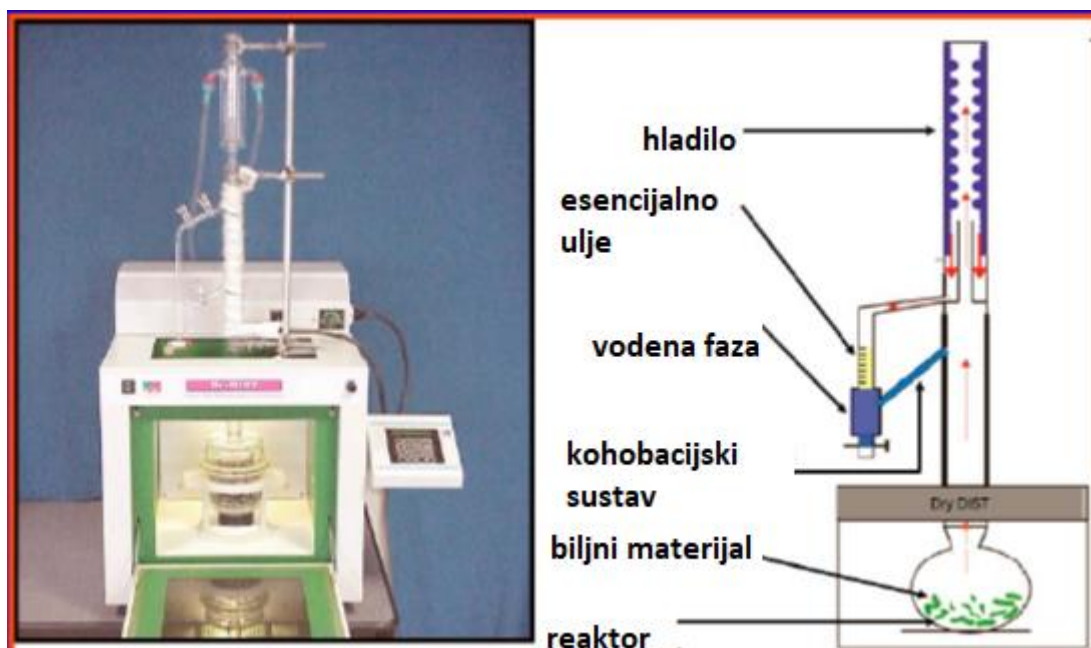
Slika 13. Elektromagnetski spektar zračenja (Anonymous 2, 2020)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima danas se najčešće koristi za ekstrakciju prirodnih komponenti iz biljnog materijala zbog znatnog smanjenja vremena ekstrakcije i upotrebe otapala, te dokazane efikasnosti (Slika 14). Mikrovalno zračenje prilikom ekstrakcije zagrijava otapalo s uzorkom, čime se pospješuje postupak ekstrakcije. Tretiranjem biljnog materijala mikrovalnim zračenjem tijekom ekstrakcije uglavnom se postiže povećanje ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita (Starmans i sur., 1996). Zagrijavanjem vode u matriksu uzorka dolazi do oslobađanja vodene pare u stanicama, što rezultira puknućem staničnih membrana. Kako se većina sekundarnih metabolita nalaze u membrani ili citoplazmi stanice, na ovaj način se pospješuje difuzija sekundarnih metabolita u otapalo te ulazak otapala u biljni materijal (Starmans i sur., 1996). U slučaju ekstrakcije biljnog materijala učinak energije mikrovalova u najvećoj mjeri ovisi o prirodi otapala i matriksu uzorka (Destandau i sur., 2013).

Princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na direktnom djelovanju mikrovalova na molekule ciljnog materijala. Transformacija elektromagnetskog zračenja u toplinsku energiju odvija se kroz dva mehanizma: ionskom kondukcijom te rotacijom dipola u otapalu i matriksu uzorka. Ionska kondukcija događa se zbog elektroforetske migracije iona pod utjecajem elektromagnetskog polja. Otpor ovakvom gibanju iona te sudari među molekulama koji su posljedica mijenjanja smjera gibanja iona. Mijenjanjem magnetskog polja dolazi do trenja, a time i do grijanja otopine (Ganzler i sur., 1990). Rotacija dipola povezana je s dodatnim gibanjem polarnih molekula koje sadrže dipolne momente (stalne ili inducirane električnim poljem) koji se pokušavaju uskladiti s nametnutim elektromagnetskim poljem. Kako se električno polje smanjuje, tako se povećava entropija sustava što rezultira oslobađanjem topline (Destandau i sur., 2013).

Postoje dvije vrste mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pod kontrolom tlaka i temperature te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Kaufmann i Christen, 2002). Sistem mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pod ekstremnim uvjetima, kao što je visoka temperatura ekstrakcije. Tlak u posudi bitno ovisi o količini i vrelištu otapala.

Mikrovalna ekstrakcija se može koristiti za razdvajanje termolabilnih spojeva, kao što su eterična ulja (Brachet i sur., 2002). Veličine čestica ekstrahiranih tvari su obično u rasponu od 100  $\mu\text{m}$ -2 mm (Spar Eskilsson i Björklund, 2000).



Slika 14. Prikaz mikrovalnog reaktora (Ferhat i sur., 2007)

### 2.3.1 Otapalo

Izbor otapala je presudan u mikrovalnoj ekstrakciji. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala da apsorbira mikrovalno zračenje. Poželjno je da izabrano otapalo ima visoku dielektričnu konstantu te da dobro apsorbira mikrovalno zračenje. Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnim zračenjem (Brachet i sur., 2002). Neovisno o tome koja se vrsta ekstrakcije provodi, odabir prikladnog otapala važan je za postizanje optimalnih uvjeta ekstrakcije. MAE se obično provodi sa istim otapalima kao u slučaju tradicionalne ekstrakcije (Destandau i sur., 2013).

### 2.3.2. Temperatura i tlak

Temperatura i tlak su važni faktori za mikrovalnu ekstrakciju, pri čemu povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. Međutim, za ekstrakciju termolabilnih spojeva, visoke temperature mogu uzrokovati razgradnju ekstrakata. U ovom slučaju, izabrana snaga mikrovalnog zračenja tijekom mikrovalne ekstrakcije mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature, što dovodi do razgradnje (Hernandez i sur., 1998). Povećanjem temperature otapalo ima veći kapacitet za otapanje ciljnih komponenti, površinska napetost i viskoznost otapala se smanjuju što pomaže vlaženju matriksa uzorka i penetraciji otapala. Za MAE temperatura ovisi o sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalno zračenje te o jačini energije. Ukoliko temperatura prijeđe temperaturu vrenja otapala, tlak postaje važna varijabla. Tlak direktno ovisi o temperaturi i omogućuje zagrijavanje iznad temperatura vrenja u zatvorenom sustavu. U slučaju ekstrakcije termolabilnih komponenta visoke temperature mogu dovesti do degradacije, što se može spriječiti uvođenjem tlaka u proces ekstrakcije (Hemwimon i sur., 2007).

### 2.3.3. Vrijeme

Jedna od glavnih prednosti MAE je vrlo kratko vrijeme ekstrakcije (minute ili sekunde) u usporedbi s drugim konvencionalnim metodama. Trajanje ekstrakcije varira ovisno o učincima vremena zračenja na mehanizme interakcija između mikrovalova i materijala kao što su biljne stanice, ciljne komponente i nečistoće. U slučaju ekstrakcije termolabilnih komponenti duga ekstrakcija može dovesti do degradacije. Ekstrakcija se također može provoditi u kraćim ciklusima umjesto jednog duljeg procesa, što povećava razinu ekstrahiranih tvari u konačnom ekstraktu (Destandau i sur., 2013).

#### 2.3.4. Snaga

Snaga mora biti ispravno podešena kako bi se minimiziralo vrijeme potrebno za postizanje odgovarajuće temperature, a da ne dođe do pregrijavanja sustava odnosno prevelikog tlaka ako se radi o zatvorenom sustavu. Treba također paziti da pod povećanom snagom sustava kroz dulji vremenski period ne dođe do isparavanja otapala. Snaga mikrovalnog zračenja koja se najčešće koristi je 600W-1000W za zatvoreni sustav i 250W za otvoreni sustav (Kaufman i Christen, 2002). Generalno, snaga zračenja od 30 do 150W pozitivno utječe na prinose ekstrakcije (Mandal i sur, 2007).

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Biljni materijal

- Osušeni listovi origana (Slika 15)



Slika 15. Uzorak origana

#### 3.2. Kemikalije

- 90%-tna vodena otopina metanola
- Deionizirana voda

#### 3.3. Aparatura i pribor

- Tehnička vaga (Slika 16)
- UV/Vis spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25 (Slika 20)
- Mikrovalni reaktor Milestone Start S (Slika 17)
- Vortex miješalica
- Laboratorijske čaše
- Erlenmeyerove tikvice
- Kivete
- Filtar 0,2  $\mu\text{m}$  PTFE
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000  $\mu\text{L}$
- Graduirane pipete
- Propipete

- Menzure
- Tikvice s okruglim dnom
- Odmjerne tikvice
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Stakleni štapići
- Magnetni štapići
- Špatula
- Boca štrcaljka

### 3.4. Priprema uzorka

Izvaže se 500 mg osušenog uzorka origana na analitičkoj vagi na papirnatoy lađici te se izvagani uzorak prebaci u tikvicu s ravnim dnom. Zatim se doda 20 mL 90%-tne vodene otopine metanola i sadržaj dobro izmiješa te se nakon toga doda magnetić koji omogućava ravnomjerno miješanje uzorka.



Slika 16. Tehnička vaga

### 3.5. Primjena mikrovalnog zračenja

Nakon pripreme, uzorak se stavlja u mikrovalni reaktor te se podešavaju snaga, temperatura i vrijeme primjene. Snaga se fiksira na 50 W jer pri većoj snazi dolazi do porasta temperature, što bi u konačnici moglo dovesti i do degradacije uzorka. Temperatura i vrijeme primjene mikrovalnog zračenja su se mijenjali tijekom izvođenja eksperimenata. Eksperimenti su



provođeni pri temperaturama 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C, a vrijeme primjene mikrovalnog zračenja bilo je 3, 6 i 9 minuta pri svakoj zadanoj temperaturi.

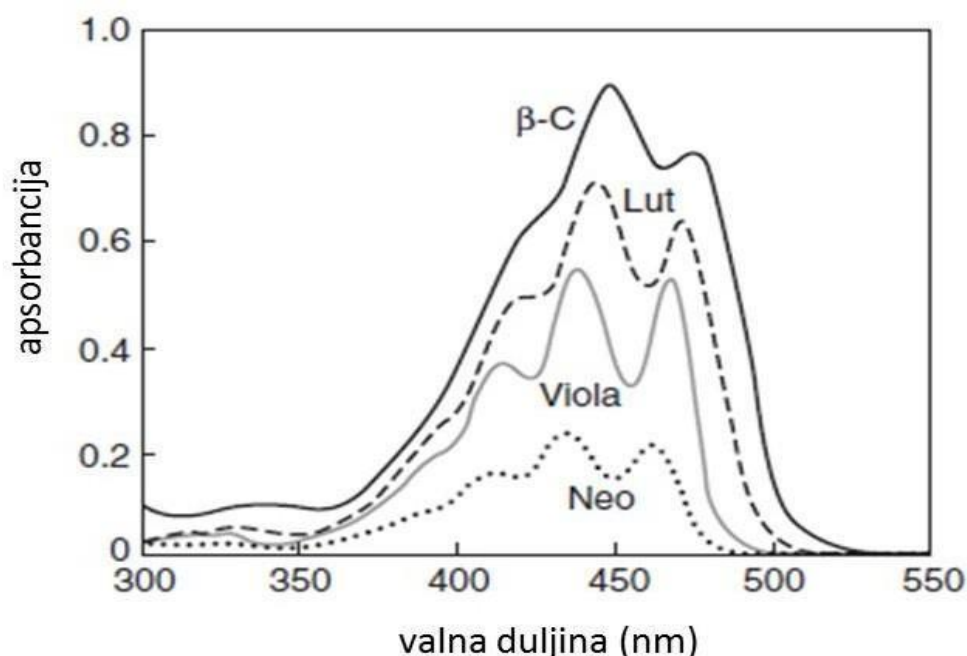


Slika 17. Mikrovalni reaktor Milestone Start S

### 3.6. Određivanje ukupne koncentracije karotenoida pomoću UV/VIS spektroskopije

Kvantitativno određivanje biljnih pigmenata (karotenoida) u biljnim ekstraktima pomoću UV/VIS spektroskopije ovisi o više faktora: otapalu, odnosno sustavu otapala korištenih za ekstrakciju, spektrofotometru i samom uzorku (Lichtenhalter i Buschmann, 2001).

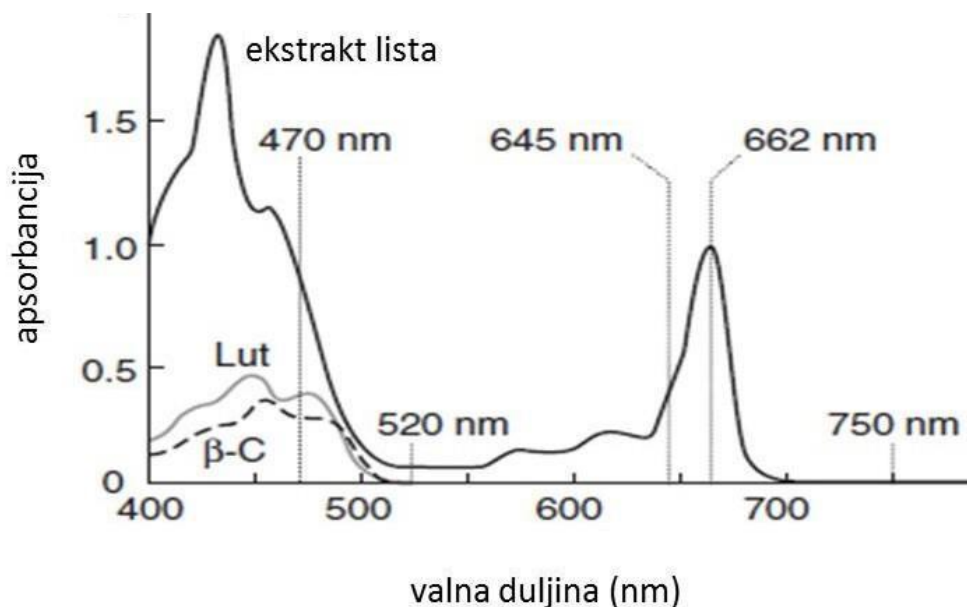
Jedan od problema koji se javlja pri identifikaciji karotenoida je taj da se apsorpcijske vrpce različitih pigmenata preklapaju. Tako su na Slici 18. prikazani apsorpcijski maksimumi između 400 i 500 nm te se uočava široka apsorpcijska vrpca izoliranih karotenoida s tri maksimuma.



Slika 18. UV/VIS apsorpcijski spektri TLC-om izoliranih najzastupljenijih karotenoida u zelenim listovima viših biljaka u dietileteru ( $\beta$ -C,  $\beta$ -karoten; Lut, lutein; Neo, neoksantin; Viola, violaksantin) (Lichtenthaler, 2001)

Položaj apsorpcijskih maksimuma pigmenata ovisi o upotrijebljenom otapalu i tipu spektrofotometra. Tako se primjerice povećanjem polarosti otapala u kojem se vrši mjerenje, apsorpcijski maksimumi pomiču za određeni iznos valne duljine, a ti pomaci proizlaze iz promjena molarnih apsorpcijskih koeficijenata i stoga se prilikom kvantitativnog određivanja pigmenata očitavaju valne duljine pri maksimumima čistih Chl a, Chl b i karotenoida u određenom otapalu. U UV/VIS spektru ekstrakta zelenih listova (Slika 19), koji sadrže biljne

pigmente karotenoide, vidljivo je da se u području valnih duljina između 400 i 500 nm nalazi široka apsorpcijska vrpca karotenoida.



Slika 19. Apsorpcijski spektri pigmenata iz acetonskog ekstrakta duhana  $\beta$ -karotena i luteina (Lichtenthaler, 2001).

Kvantitativno određivanje pigmenata u smjesi pomoću UV-VIS spektroskopije temelji se na Lambert-Beerovom zakonu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdje je  $A$  apsorbanca na danoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $l$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a  $c$  je množinska koncentracija tvari u otopini. U tom se obliku Lambert-Beerov zakon može koristiti isključivo za određivanje koncentracije pojedinačnog, izoliranog pigmenta. Naime, uslijed promjene otapala, valne duljine svjetlosti ili prisutnosti drugih kemijskih vrsta mijenja se i apsorpcijski koeficijent.

U ekstraktima biljnog materijala koji sadrže karotenoide, ksantofile i karotene ( $x + c$ ) apsorbanca pri 470 nm određena je sumom apsorbanca Chl a, Chl b i karotenoida

$$A_{470} = A_{(a)470} + A_{(b)470} + A_{(x+c)470}$$

Ako se primjeni Lambert-Beerov zakon:

$$A_{(a)470} = \varepsilon_{(a)470} \cdot c_a \cdot l$$

$$A_{(b)470} = \varepsilon_{(b)470} \cdot c_b \cdot l$$

$$A_{(x+c)470} = \varepsilon_{(x+c)470} \cdot c_{x+c} \cdot l$$

Uzevši u obzir da je uobičajena duljina puta svjetlosti 1 cm slijedi izraz za koncentraciju ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena:

$$c_{(x+c)} = \frac{A_{(x+c)470} - (\varepsilon_{(a)470} \cdot c_a) - (\varepsilon_{(b)470} \cdot c_b)}{\varepsilon_{(x+c)470}}$$

Ako se želi odrediti masena koncentracija Chl a, Chl b i karotenoida u primjerice 90%-tnom metanolnom ekstraktu koriste se literaturno dostupni podaci o molarnim apsorpcijskim koeficijentima čistih tvari u pojedinom otapalu ili smjesi otapala pa se izrazi mogu pojednostavniti:

$$\gamma_a / \mu\text{g mL}^{-1} = 16,28 A_{665,2} - 9,28 A_{652,4}$$

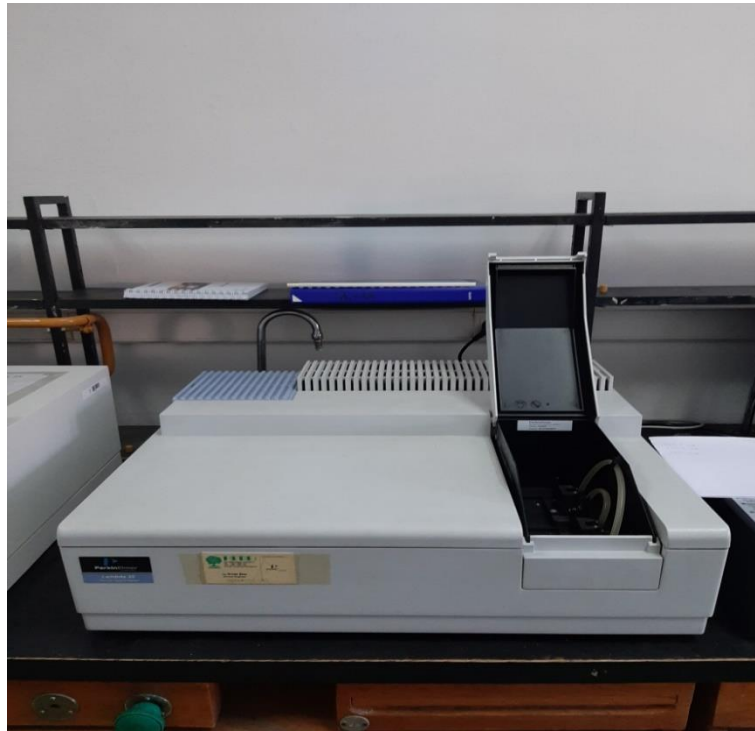
$$\gamma_b / \mu\text{g mL}^{-1} = 36,92 A_{652,4} - 16,54 A_{665,2}$$

$$\gamma_{(x+c)} / \mu\text{g mL}^{-1} = \frac{(1000 A_{470} - 1,91 \gamma_a - 95,15 \gamma_b)}{225}$$

Parametri snimanja na UV/VIS spektrofotometru (Slika 20):

- početna valna duljina: 350 nm
- konačna valna duljina: 700 nm
- interval: 0,2 nm
- brzina snimanja: 480 nm/min

Masena koncentracija karotenoida u 90%-tnom metanolnom ekstraktu listova origana određuje se pomoću UV/VIS spektrofotometra primjenom Lichtenhalterovih jednadžbi. Apsorbancija 90%-tnih metanolnih ekstrakata mjeri se u dvoznačnom UV/VIS spektrofotometru, a pritom se u jednu kvarcnu kivetu stavlja čisti 90%-tni metanol, a u drugu ekstrakt. Očitava se apsorbanca otopine pri valnim duljinama 665,2 nm, 652,4 nm i 470 nm, a onda se korištenjem Lichtenhalterovih jednadžbi izračuna masena koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u ekstraktu.



Slika 20. UV/VIS spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25

## 4. Rezultati i rasprava

Primjena mikrovalnog zračenja pri ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala rezultira boljim iskorištenjem, kraćim vremenom ekstrakcije, manjim utroškom otapala, ali i energije u usporedbi sa klasičnim metodama ekstrakcije. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem zbog ovih osobina ubraja se u „zelene“ metode ekstrakcije.

Uzorci koji su korišteni u ovom radu su osušeni listovi origana preostali nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem.

Cilj rada je bio ispitati utjecaj mikrovalnog zračenja na koncentraciju karotenoida, ksantofila i karotena u biljnom materijalu, odnosno origanu. Svi uzorci su imali masu 500 mg te im je dodano 20 mL otapala, a ekstrahirani su pri temperaturama od 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C u vremenskom razdoblju od 3, 6 i 9 minuta. U Tablici 1. prikazani su utjecaji temperature i vremenskog perioda tretiranja uzorka na masenu koncentraciju pigmenata u ekstraktu.

Tablica 1. Prikaz utjecaja temperature i vremena na masenu koncentraciju karotenoida u 90%-tnom metanolnom ekstraktu origana

UZORAK	3 min	6 min	9 min
	$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$
35 °C	0,515	0,534	0,555
40 °C	0,486	0,552	0,674
45 °C	0,667	0,678	0,774
50 °C	0,688	0,851	1,122

Iz priložene tablice se vidi porast masene koncentracije karotenoida u biljnom ekstraktu i to porast koncentracije s porastom vremena. Pri 35 °C masena koncentracija karotenoida raste od koncentracije 0,515 mg/mL preko koncentracije od 0,534 mg/mL do konačne koncentracije koja iznosi 0,555 mg/mL. Pri 40 °C masene koncentracije karotenoida su rasle od prvog iznosa 0,486 mg/mL, zatim koncentracije 0,552 mg/mL te do krajnje koja iznosi 0,674 mg/mL. Pri 45

°C rast koncentracija je od 0,667 mg/mL preko 0,678 mg/mL do konačne koncentracije od 0,774 mg/mL, a pri 50 °C masena koncentracija karotenoida je rasla od prve koja iznosi 0,688 mg/mL, zatim koncentracija od 0,851 mg/mL te do najveće koja iznosi 1,122 mg/mL. Pri svim temperaturama je uočen rast masene koncentracije karotenoida s odmakom vremena kao i rast koncentracije s porastom temperature.

Također iz priložene tablice se može vidjeti porast masene koncentracije karotenoida u biljnom ekstraktu i to porast koncentracije s porastom temperature ekstrakcije. Pri vremenu od 3 minute masena koncentracija karotenoida raste od početne 0,515 mg/mL, zatim je zabilježen blagi pad od 0,486 mg/mL, ali zato slijedi rast na koncentraciju 0,667 mg/L te rast do najviše koncentracije koja iznosi 0,688 mg/mL. Pri vremenu tretiranja od 6 minuta masena koncentracija raste od 0,534 mg/mL preko iznosa 0,552 mg/mL, zatim slijedi koncentracija od 0,678 mg/mL te konačan iznos 0,851 mg/mL. Pri vremenu tretiranja od 9 minuta masena koncentracija karotenoida je rasla od 0,555 mg/mL, preko 0,674 mg/mL i 0,774 mg/mL do konačnog iznosa 1,122 mg/mL. Na svim vremenima tretiranja mikrovalnim zračenjem uočen je rast masene koncentracije karotenoida (izuzev drugog iznosa pri vremenu tretiranja od 3 minute), a također je vidljiv porast masene koncentracije karotenoida porastom vremena tretiranja mikrovalnim zračenjem.

Dobiveni podaci se slažu s istraživanjem kojeg su proveli Saini i Keum (2018) u kojem su došli do zaključka da je mikrovalna ekstrakcija zelena metoda koja ima veliku moć ekstrakcije te da porastom temperature i vremena tretiranja koncentracija ekstrahiranih pigmenata raste, no imajući u vidu termolabilnost karotenoida ne preporučava se primjena temperature veće od 60 °C.

## 5. Zaključak

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Masena koncentracija karotenoida, ksantofila i karotena u metanolnom ekstraktu lišća origana je određena primjenom UV/VIS spektroskopije.
- Uslijed izlaganja mikrovalnom zračenju, koncentracija karotenoida je rasla s porastom temperature u mikrovalnom reaktoru.
- Također, uslijed izlaganja mikrovalnom zračenju koncentracija karotenoida je rasla s porastom vremena tretiranja u mikrovalnom reaktoru.



## 6. Popis literature

Anonymous 1 (2020) ,

<<https://www.everwilde.com/store/Vulgare-Oregano-Herb-Seeds.html>>Pristupljeno

07.04.2020.

Anonymous 2 (2020),

<<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=infracrveno+zra%C4%8Denje>>Pristupljeno

08.07.2020.

Azzouz M. A., Bullerman L. B. (1982) Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents *J. Food Prot.* **45** (14): 1298–301.

Baricevic D., Bartol T. (2002) The biological/pharmacological activity of the oregano genus, in Kintzios S (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles – Oregano: The Genera Origanum and Lippia.*, Taylor & Francis, London, 177–214.

Biondi D., Cianci P., Geraci C, Ruberto G., Piattell M. (1993) Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants *Flavour Fragr. J.* **8** (6): 331–337.

Brachet A., Christen P., Veuthey J. L. (2002): Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves *Phytochem. Anal.* **13**: 162–169.

Britton G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* **9**: 1551–1558.

Bullerman L. B., Liew F. Y., Seier S. A. (1977) Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol *J. Food Sci. Chicago* **42** (6): 1107–1109.

Charai M., Faid M., Chaouch A. (1999) Essential oils from aromatic plants (*Thymus broussonetti* Boiss, *Origanum compactum* Benth, and *Citrus limon* (L) NL Burm) as natural antioxidants for olive oil *J. Essent. Oil Res.* **11** (4): 517–521.

Curtis O. F., Shetty K., Cassagnol G., Peleg M. (1996) Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol and thymol) on food spoilage yeast (*Debaromyces hansenii*) *Food Biotechnol.* **10** (1): 55–73.

- Daw Z. Y., El-Baroty G. E., Ebtesam A. M. (1994) Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production by some essential oils *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **16** (5/6): 129–135.
- Deighton N., Glidewell S. M., Deans S. G., Goodman B. A. (1993) Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils *J. Sci. Food Agric.* **63**: 221–225.
- Destandau E., Michel T., Elfakir C. (2013) Microwave - assisted Extraction, U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113-135.
- Dorofeev A. N., Khort T. P., Rusina I. F., Khmel'nitskii Y. V. (1989) Search for antioxidants of plant origin and prospects of their use, *Sbornik Nauchnykh Trudov Gosudarstvennyi Nikitski Botanicheskii Sad* **109**: 42–53.
- Eisenhauer B., Natoli S., Liew G., Flood V.M. (2017) Lutein and Zeaxanthin—Food Sources, Bioavailability and Dietary Variety in Age-Related Macular Degeneration Protection. *Nutrients* **9**: 120 – 132.
- Eskilsson S., Bjorklund E. (2000): Analytical-scale microwave-assisted extraction *J. Chrom. A.* **902**: 227–250.
- Ferhat M. A., Tigrine-Kordjani N., Chemat S., Meklati B. Y., Chemat F. (2007) Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: Solvent extraction device *Chromatographia* **65**: 217–222.
- Fraser P. D., Bramley P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids *Progress in Lipid Research* **43**: 228 – 265.
- Ganzler K., Szinai I., Salgo A. (1990) *A. J. Chromatogr. A.* **520**: 257.
- Gerster H. (1997) The potential role of lycopene for human health *J. Am. Coll. Nutr.* **16**: 109–126.
- Greuter W., Burdet H. M., Long G. (1986) Med-Checklist, Vol. 3. Editions de Conservatoire de Jardin Botaniques de la Ville de Geneve, Switzerland.

- Halliwell B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 33–50.
- Hansson M. C., Foley B. P. (2008) Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck *J. Arch. Sci.* **35**: 1169–1176.
- Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk A. (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Separation and Purification Technology* **54** (1): 44–50.
- Hernandez F., Font N., Hogendoorn E. A., Baumann R. A., Van Zoonen P. (1998). Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *Journal of Chromatography A* **798**: 179–186
- Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Sakai S., Kurata H. (1980) Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 818–822.
- Holland B., Unwin I., Buss D. (1991) *The Composition of Foods: Vegetables, Herbs and Spices*, McCance & Widdowson's, Bath.
- Hussein A. S. M. (1990) Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants *Planta Med.* **56**: 644–5.
- Ietswaart J. H. (1980) *A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*, Leiden University Press, The Hague.
- Izzo A. A., Carlo G., Biscardi D., Fusco R., Mascolo N., Borrelli F., Capasso F., Fasulo M. P., Autore G. (1995) Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity *Phytotherapy Res.* **9** (4): 281–286.
- Johnson E.J., Mayer J. (2016) Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids>> Pristupljeno 20.04.2020.
- Kaufmann B., Christen P. (2002): Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction *Phytochem. Anal.* **13**: 105–113.
- Kostić V., Kostić Lj. (1980) *Kemijsko tehnološki leksikon*, Izdavačka radna organizacija "Rad" Beograd, str. 648.

Kintzios S.E. (2012) *Oregano: Handbook of Herbs and Spices* (Second edition) , Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 2012, str. 417-436.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy U: Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA), Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., ur., John Wiley and Sons, F4.3.1- F4.3.8

Makri O. (2002) Cultivation of oregano, in Kintzios S (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles – Oregano: The Genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 153–162.

Mandal V., Mohan Y., Hemaltha S.(2007) Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research *Pharmacognosy Reviews* **1**: 7-18.

Mirovich V. M., Peshkova V. A., Shatokhina R. K., Fedoseev A. P. (1989) Phenolcarboxylic acids of *Origanum vulgare*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **25** (6): 850–851.

Schmitz S., Weidenbörner M., Kunz B. (1993) Herbs and spices as selective inhibitors of mould growth *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **15** (5/6): 175–177.

Namitha K. K., Negi P. S. (2010) Chemistry and Biotechnology of Carotenoids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50:8, 728-760.

Pausas J. G., Millán M. M. (2019) Greening and browning in a climate change hotspot: the Mediterranean Basin. *BioScience* **69**: 143-151

Rao A. V., Rao L. G. (2007) Carotenoids and human health *Pharmacol Res.* **55** (3): 207–216.

Saini R. K., Keum Y. (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments *Food Chemistry* **240**: 90-103.

Shekarforoush S. S., Nazer A. H. K., Fi Rouzi R., Rostami M. (2007) Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichiacoli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran *Food Cont.* **18** (11): 1428–1433.

Sies H.(1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**: 1058–1071.

Sies H., Stahl W.(1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1315S–1321S.

Singletary K.W. (2010) Oregano: Overview of the Literature on Health Benefits *Nutrition Today* **45** (3):129-138.

Starmans D.A.J., Nijhuis H.H. (1996) *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 191.

Truscott T.G. (1990) The photophysics and photochemistry of the carotenoids *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **6**: 359–371.

Szalay J. (2015) What Are Carotenoids? <<https://www.livescience.com/52487-carotenoids.html>>\_Pristupljeno 01.05.2020.

Van den Berg H., Faulks R., Fernando Granado H., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S., Stahl W. (2000) The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects *J. Sci. Food Agric.* **80** (7): 880-912.

Young A. J., Lowe G. M. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 20–27.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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



---

ime i prezime studenta