

# Enzimaska i ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva kadulje

---

Supičić, Alen

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*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:159:151585>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Alen Supičić**  
0058215131

**Enzimska i ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva  
kadulje**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Analitička kemija**

**Mentor: doc. dr. sc. Maja Dent**

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

## Enzimska i ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva kadulje

Alen Supičić, 0058215131

**Sažetak:** Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je biljka bogata polifenolnim spojevima. U ovome radu se istraživao kakav utjecaj ima enzimski predtretman listova kadulje (ksilanaza, celulaza, pektinaza i kombinacija sva tri enzima (1:1:1, koncentracija 0,2 i 2 mg/mL u 0,05M citratnom puferu pri pH=6,5, pri 40 °C tijekom 1 i 4 sata te ultrazvučna ekstrakcija pri snazi 200 W, i vremenu ekstrakcije od 5 minuta na maseni udio ukupnih polifenola. Otapala koja su se koristila kod ultrazvučne ekstrakcije su vodene otopine: etanola, metanola i acetona (1:1, v/v). Maseni udjeli ukupnih polifenola u ekstraktima nakon ultrazvučne ekstrakcije određeni su spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin- Ciocâlteu reagensom. Za statističku obradu rezultata korištena je analiza varijanci (ANOVA) i Tukeyev test. Statističkom obradom dobivenih rezultata može se zaključiti da predtretman pektinazom značajno doprinosi povećanju masenog udjela ukupnih polifenola u odnosu na druge enzime. Također, postoji trend povećanja masenih udjela ukupnih polifenola u ekstraktima s povećanjem koncentracije enzima i vremena trajanja predtretmana s 1 sat na 4 sata. Najveći maseni udjel ukupnih polifenola u ekstraktu kadulje je određen u uzorku gdje se kao otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju koristila vodena otopina metanola (1:1, v/v), a kao enzim za predtretman pektinaza (19,79 mg GAE/g suhe biljke).

**Ključne riječi:** kadulja, enzimi, ultrazvučna ekstrakcija, otapala, polifenoli

**Rad sadrži:** 35 stranica, 7 slika, 8 tablica, 59 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Maja Dent

**Datum obrane:** 13. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition Science

### Enzymatic and ultrasonic extraction of sage phenolic compounds

Alen Supičić, 0058215131

**Abstract:** The common sage (*Salvia officinalis* L.) is a plant rich in polyphenolic compounds. This study investigated the effect of an enzymatic pretreatment of the common sage using xylanase, cellulase, pectinase and a combination of all three enzymes (1:1:1), in concentrations of 0.2 and 2 mg/mL in 0.05M citrate buffer at pH 6.5 and 40 °C during either 1 or 4 hours, as well as of a subsequent ultrasonic extraction using 200W, 5 min extraction time on the mass fraction of total polyphenols. Solvents used in the ultrasonic extraction were aqueous ethanol, methanol and acetone solutions (1:1, v/v). Total polyphenol mass fractions after the ultrasonic extraction were spectrophotometrically, based on a color reaction of phenols with the Folin-Ciocalteu reagent. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used for statistical analysis of the results. The pretreatment with pectinase significantly contributes to the increase in the total polyphenol mass fraction, compared to other enzymes. Also, there is a trend of increasing the total polyphenol mass fractions using increased enzyme concentrations and increasing pretreatment duration from 1 to 4 hours. The highest total polyphenol mass fraction using the ultrasonic extraction was found when aqueous methanol solution (1:1, v/v) was used as the solvent, and pectinase was used as the pretreatment enzyme (19.79 mg GAE/g of dry plant).

**Keywords:** sage, enzymes, ultrasonic extraction, solvents, polyphenols

**Thesis contains:** 35 pages, 8 figures, 8 tables, 59 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Maja Dent, PhD, assistant professor

**Thesis defended:** September 13<sup>th</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LJEKOVITA, DALMATINSKA KADULJA (<i>SALVIA OFFICINALIS L.</i>).....</b>	<b>2</b>
2.1 KEMIJSKI SASTAV .....	3
2.1.1 DJELOVANJE I UPOTREBA .....	4
2.1.2 UPOTREBA U PREHRANI .....	4
2.2 POLIFENOLNI SPOJEVI.....	5
2.2.1 FLAVONOIDI .....	5
2.2.2. FENOLNE KISELINE.....	7
2.2.3. OSTALI SPOJEVI .....	7
2.2.4. POLIFENOLNI SPOJEVI U KADULJI .....	8
2.3 METODE EKSTRAKCIJE .....	9
2.3.1 KLASIČNA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA .....	9
2.3.2 EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ULTRAZVUKOM.....	10
2.3.3 EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ENZIMIMA.....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI.....	12
3.2 STANDARDI I KEMIKALIJE .....	12
3.3 APARATURA I PRIBOR.....	13
3.4 METODE RADA .....	13
3.4.1 EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ULTRAZVUKOM.....	14

3.4.2 PREDTRETMAN ENZIMIMA .....	14
3.4.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM NAKON PREDTRETMANA ENZIMIMA .....	15
3.4.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA .....	15
3.5 STATISTIČKA OBRADA .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>18</b>
4.1 ODREĐIVANJE OPTIMALNOG VREMENA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE .....	18
4.2. UTJECAJ ENZIMSKOG PREDTRETMANA I EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ENZIMIMA NA UKUPNE IZOLIRANE POLIFENOLNE SPOJEVE IZ LISTA KADULJE .....	19
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>28</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>29</b>

## 1. UVOD

Ljekovita ili dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis* L.) je autohtona samonikla mediteranska biljka koja sadrži veliki broj različitih bioaktivnih spojeva koji joj daju antiupalna, antitumorska, antimikrobna i druga svojstva (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017). Jedna velika skupina tih bioaktivnih spojeva su polifenoli. Ekstrakti kadulje sadrže značajne udjele polifenolnih spojeva, a kako ne postoji standardni postupak ekstrakcije istražuju se različite metode ekstrakcije koje bi dale najbolje rezultate i veće prinose polifenolnih spojeva. Klasični postupci ekstrakcije zbog dugog vremena zagrijavanja mogu djelovati nepovoljno na termolabilne spojeve, pa se istražuju druge pogodnije i ekološki prihvatljivije metode. U cilju povećanja ekstrakcijskog kapaciteta pri izolaciji polifenolnih spojeva kadulje te smanjenja vremena ekstrakcije istražuju se postupci ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalovima, enzimima, primjenom ekološki prihvatljivih otapala. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na efikasnost ekstrakcije polifenolnih spojeva kadulje uz što kraće vrijeme ekstrakcije. Zatim, ispitati učinak predtretmana enzimima ksilanazom, pektinazom, celulazom te kombinacijom tih triju enzima (1:1:1) pri različitim koncentracijama enzima (0,2-2 mg/mL) u 0,05M citratnom puferu (pH=6,5) pri 40 °C i pri različitim vremenima tretiranja biljnog materijala (1 i 4 sata). Nakon predtretmana s enzimima provela se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz primjenu vodenih otopina etanola, metanola i acetona (1:1, v/v) pri vremenu od 5 min i primjenjenoj snazi od 200 W. Spektrofotometrijskim određivanjem ukupnih polifenolnih spojeva određeni su maseni udjeli polifenolnih spojeva te se statističkom analizom utvrdio statistički značajan utjecaj procesnih parametara ekstrakcije i enzimskog predtretmana na efikasnost ekstrakcije.

## 2. Ljekovita, dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis* L.)

Ljekovita ili dalmatinska kadulja je biljka koja prirada porodici Lamiaceae koja sadrži oko 7500 različitih vrsta biljaka koje rastu po cijelome svijetu, a ljekovita kadulja je jedna od glavnih predstavnika te porodice. Naziv roda *Salvia* veže svoje korijene iz latinske riječi *salvere* što bi značilo osjećati se dobro, a to govori da se je još od antičkih doba kadulja zbog svojih svojstava smatrala ljekovitom biljkom. Rod *Salvia* ima više od 900 različitih vrsta biljaka, a od kadulja najpoznatije su dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis* L.), grčka kadulja (*Salvia fruticosa* L.) i muškata kadulja (*Salvia sclarea* L.). Dalmatinsku kadulju (*Salvia officinalis* L.) (u daljnjem tekstu: kadulja) opisao je još 1753. godine Carl Linné.

**Tablica 1.** Sistematika kadulje (*Salvia officinalis* L.)

Taksonomska kategorija	Naziv
<b>Porodica (<i>familia</i>)</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Podporodica (<i>subfamilia</i>)</b>	<i>Nepetoideae</i>
<b>Tribus (<i>tribus</i>)</b>	<i>Salvieae</i>
<b>Subtribus (<i>subtribus</i>)</b>	<i>Salvinae</i>
<b>Rod (<i>genus</i>)</b>	<i>Salvia</i> L.
<b>Podrod (<i>subgenus</i>)</b>	<i>Salvia</i>
<b>Vrsta (<i>species</i>)</b>	<i>Salvia officinalis</i> L.

Kadulja je višegodišnja biljka koja raste u obliku drvenastog polugrma visine do 60 cm. Raste na nadmorskoj visini do 1000 m na kršnom tlu duž čitavog obalnog područja. Otporna je na dugotrajne suše te je vrlo važna jer svojim korijenom sprečava eroziju tla krškog područja. Dobro uspijeva na vapnenastom tlu bogatom dušikom. Stabljike su u uspravnom ili polegnutom položaju s mnogobrojnim fino-dlakavim tamnozelenim granama. Listovi kadulje su zeleno-sive boje, dugi, promjera 1–4 cm te dužine 4–10 cm. Ljubičasti cvjetovi nalaze se u grozdovima. Listovi kadulje beru se u svibnju ili lipnju prije cvatnje kada su prisutne najveće količine aktivnih komponenti.

Kadulja spada u skupinu balkansko-apeninskih endema te je široko rasprostranjena osim u obalnom području Republike Hrvatske, u Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Albaniji, Italiji. Također, kadulja se uzgaja u mnogim zemljama svijeta s kontinentalnom klimom: Ukrajina, Moldavija, Njemačka, Slovačka, Bugarska, Rumunjska, Italija, Velika Britanija, Kanada, SAD,



Turska, Indija, Japan, Indonezija (Java), Tanzanija, Južna Afrika, Antili, Brazil, Australija i Novi Zeland (Grdiša i sur., 2015)

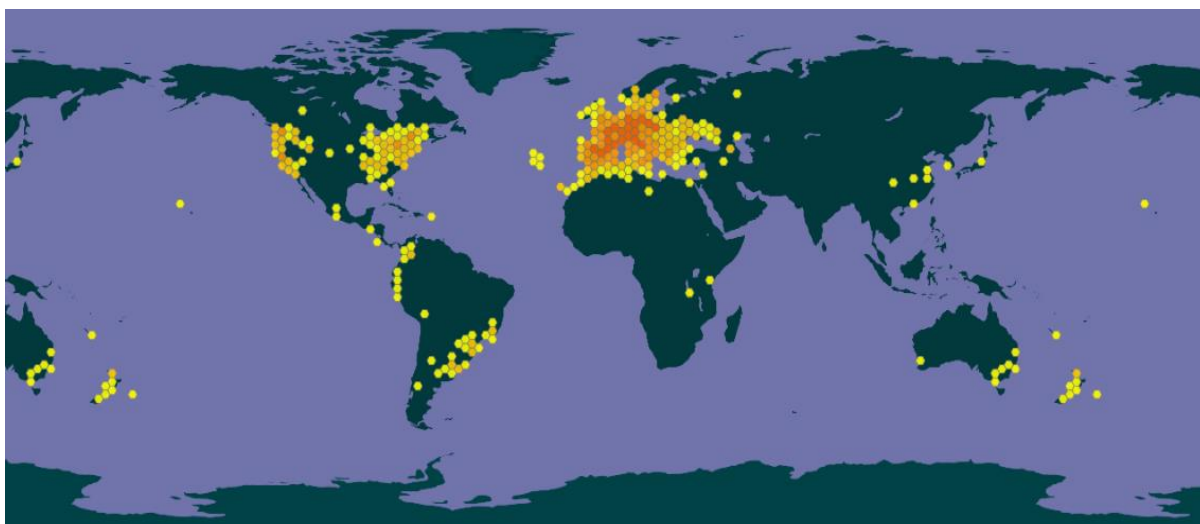


a)



b)

**Slika 1.** prikaz a) cvijeta i b) lista i ploda (Šarić, 2016.)



**Slika 2.** Geografska rasprostranjenost kadulje (*Salvia officinalis* L. in The Royal Botanic Gardens, Kew. (2021)

## 2.1 Kemijski sastav

List kadulje je raznolikog kemijskog sastava pa tako sadrži različite minerale, vitamine i antioksidanse te značajne količine eteričnoga ulja. Gledano s nutritivnoga aspekta kadulja sadrži značajne količine cinka, magnezija i željeza od minerala, a od vitamina sadrži vitamin K, vitamin C i vitamin E. Primjerice, 1 čajna žličica sušene kadulje tj. 0,7 g kadulje sadrži: 2,2

kcal, 0,425 g ugljikohidrata, 0,074 g proteina, 0,09 g masti i 0,056 g vode (USDA 2022.). Treba napomenuti da kemijski sastav i udio polifenolnih spojeva u *S. officinalis* varira ovisno o okolišnim uvjetima kao što su klima, dostupnost vode i nadmorska visina (Russo i sur., 2013). List kadulje sadrži eterično ulje (do 3%) s najvećim udjelom oksigeniranih monoterpena ( $\alpha$ - i  $\beta$ - tujon, kamfor, borneol, 1,8-cineol), seskviterpena, i fenilpropan derivata (Miljanović i sur., 2020). Od polifenolnih spojeva najzastupljeniji su derivati hidroksicimetnih kiselina, među kojima je najzastupljenija ružmarinska kiselina. Od flavonoida su zastupljeni flavon glikozidi (Dent i sur., 2013).

### **2.1.1 Djelovanje i upotreba**

*Salvia officinalis* koristi se u medicinske svrhe tisućama godina. Kadulja je korištena za liječenje mnogih simptoma i bolesti te ima povijesnu pozadinu koja datira do starogrčkog i rimskog doba. Zbog dokazanih antiseptičkih svojstava koristi se kod uboda insekata (Altindal i Altindal, 2015, Cenić-Milošević i sur., 2013). Kadulja zbog visokog udjela polifenolnih spojeva posjeduje snažna antioksidativna svojstva, pa se stoga koristi za liječenje bolesti povezanih sa starenjem kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, anksioznost i depresija (Obulesu i Rao, 2011; Arica i sur., 2012). Osim toga, kadulja zbog svog antimikrobnog djelovanja koristi se kao vodica za ispiranje usta kod upala grla, inficirane gingive, čireva u ustima i prehlade. Također, dokazano je da kadulja smanjuje lučenje znoja na cijelom tijelu (Tober i Schoop, 2019). Kadulja ima dokazano sedativno, antimikrobno, antioksidativno, antitumorsko, antihipertenzivno djelovanje (Hao i sur., 2015, Ezema i sur., 2022).

### **2.1.2 Upotreba u prehrani**

Kadulja je od davnina imala važno mjesto u prehrani ljudi kao čaj ili začim, koristili su je još stari Grci i Rimljani. Kadulja se koristila u svježem obliku kako bi se produžila trajnost mesnih proizvoda, ali i da bi poboljšala okus raznih jela. Najčešća upotreba lista kadulje u svježem ili sušenom obliku je kao čaj. Kadulja se zbog intenzivnog mirisa i okusa najčešće dodaje mesnim jelima (patka, guska, kokoš i divljač). Svježi listovi kadulje mogu se dodati lisnatom tijestu, sokovima, sirupima, sladoledima, keksima, pecivima, kolačima, sirevima i umacima kako bi poboljšala okus gotovih proizvoda. *Salvia officinalis* ima komercijalnu važnost u prehrambenoj

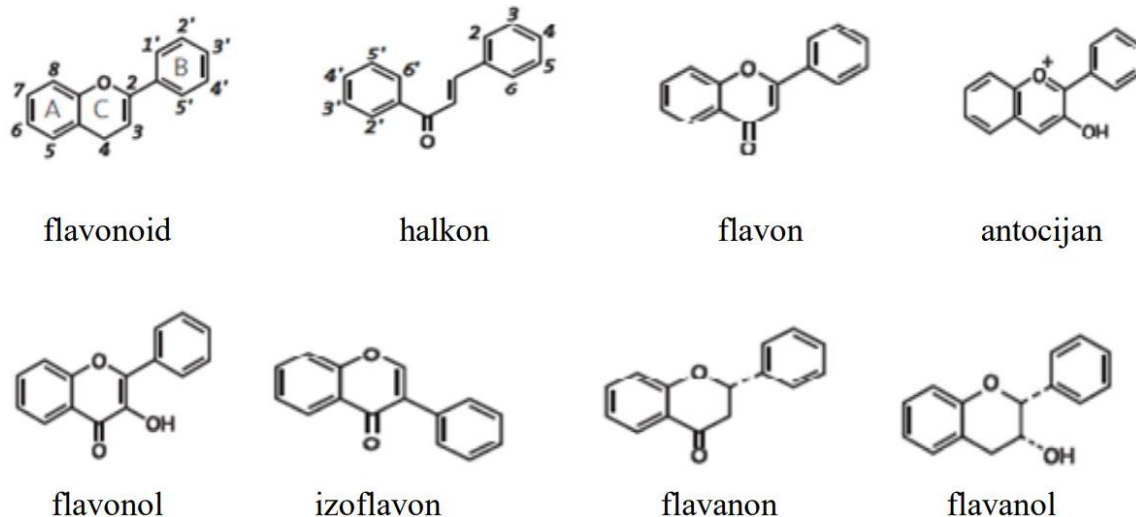
industriji kao prirodni antioksidans. Antioksidativno djelovanje kadulje posebno je povezano s udjelom polifenolnih komponenti u kadulji (Altindal i Altindal, 2015, Grdiša i sur., 2015). Kadulja je i poznata medonosna biljka, kaduljin med je crveno-smeđe boje, jakog i aromatičnog okusa i mirisa, bogat flavonoidima (Altindal i Altindal, 2015).

## 2.2 Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su fitokemikalije, zastupljene u svim biljnim vrstama (Dai i Mumper, 2010). Polifenolni spojevi su vrlo raznoliki i obuhvaćaju nekoliko podskupina, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, flavoni, flavonoli, flavanoni, tanini te ostali spojevi među kojima su stilbeni (Dai i Mumper, 2010). Polifenoli su spojevi različitih struktura, sastoje se od jednog ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010).

### 2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi imaju C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub> opću strukturnu okosnicu u kojoj su dvije C<sub>6</sub> jedinice (prsten A i prsten B) fenolne strukture (slika 3). Flavonoidi su podjeljeni u šest podskupina: kao što su flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijani.



**Slika 3.** Kemijske strukture flavonoida (Kurtagić, 2017)

**Flavoni** su polifenolni spojevi kod kojih je karbonilna skupina prisutna na C<sub>4</sub> položaju, a fenolni prsten je vezan na heterociklički prsten na položaj C<sub>2</sub>; osim toga, postoji dvostruka veza između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma. Najvažniji flavoni su luteolin i apigenin.

**Flavonoli** (dihidroflavonoli) su 3-hidroksi derivati flavanona. Od flavona se razlikuju po prisutnosti hidroksilne skupine u položaju C3 (de Oliveira i sur., 2014). Neki od najpoznatijih i istraženih flavonola (u obliku aglikona) su kamferol i kvercetin. Zanimljivo je da ovi spojevi mogu postojati u više od 270 različitih glikozidnih oblika (Tsao, 2010).

Za razliku od flavonola i flavona, koji imaju karbonilnu skupinu na vrhu C4 položaja, heterociklički prsten u flavanonima ima zasićeni lanac s tri ugljika bez hidroksilne skupine na položaju C3. **Flavanone** karakterizira veliki broj supstituiranih derivata (npr. prenilirani flavanoni i benzilirani flavanoni) zbog njihovih jedinstvenih supstitucijskih obrazaca (Reis Giada, 2013). Supstitucija hidroksilne grupe na poziciji C7 s disaharidom je uobičajeni oblik glikoziliranih flavanona. Flavanoni se uglavnom nalaze u visokim koncentracijama u agrumima kao što su naranče (npr. hesperidin) i limun (npr. eriodiktiol), i većina ovih spojeva su prisutni u obliku aglikona (de Oliveira i sur., 2014).

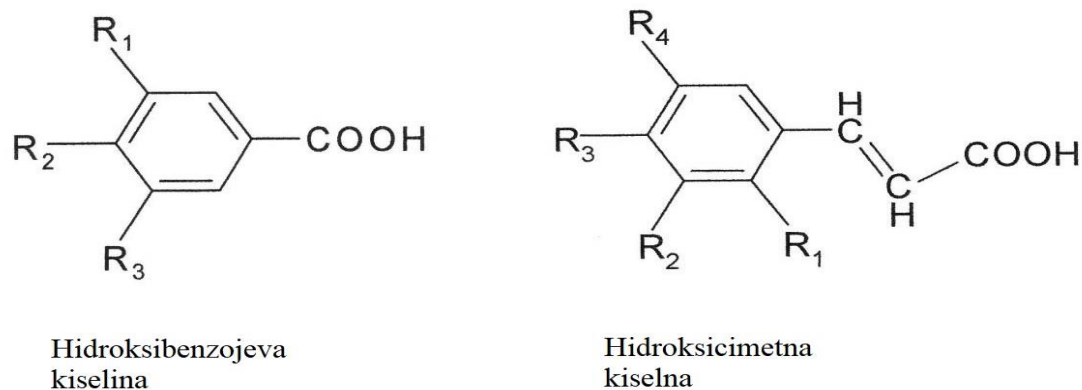
**Antocijanidini i antocijanini** razlikuju se od ostalih flavonoida zbog prisutnosti dviju dvostrukih veza u njihovim heterocikličkim prstenovima. Antocijanini su glikozilirani oblik antocijanidina, a karakterizirani su različitim obrascem hidroksilacije i metoksilacije na fenolnom prstenu (Reis Giada, 2013). Varijacije u broju hidroksilnih skupina te prirodi i broju na njihovu strukturu vezanih šećernih jedinica rezultiraju velikom raznolikošću antocijanina. Jedinice šećera koje su obično vezane su monosaharidi, npr. glukoza, galaktoza i arabinoza (Ozcan i sur., 2014). Glikozilirani antocijanini su pigmenti topivi u vodi koji su prisutni u šarenom cvijeću i voću; većina njihovih boja može se pripisati ovim spojevima.

**Flavanoli** (flavan-3-oli) sadrže zasićeni heterociklički prsten i nemaju dvostruke veze između C2 i C3 i hidroksilne skupine na položaju C3. Za razliku od drugih klasa flavonoida, flavanoli nalaze se u hrani samo kao aglikoni (Singla i sur., 2019). Osim toga, mogu se naći kao monomerne jedinice, koje se nazivaju katehini i epikatehini te kao polimerni oblici koji se nazivaju tanini (Lattanzio, 2013). Prisutnost hidroksilne skupine vezane na položaj C3 objašnjava dva kiralna centra, s posljedičnom karakterizacijom katehina i epikatehina kao dijastereoizomera. Polimerni flavanoli pokazuju dobru topljivost u vodi i relativno visoku molekulsku masu te su poznati kao kondenzirani tanini. Tanini, koji se nalaze u kompleksima s alkaloidima, polisaharidima i proteinima, mogu se dalje podijeliti na hidrolizabilne tanine i kondenzirane tanine (poznate i kao proantocijanidini). Polimeri katehina, epikatehina i/ili leukoantocijanidina, tradicionalno zvani kondenzirani tanini, najzastupljeniji su polifenoli u drvenastim biljkama. Kondenzirani tanini dobili su naziv proantocijanidini zbog svoje sposobnosti pretvaranja u antocijanidine pod oksidativnim uvjetima (Vladimir-Knežević i sur.,

2012). Esteri galne i elaginske kiseline poznati su kao hidrolizabilni tanini. Molekula glukoze je središte molekule tanina koja se može hidrolizirati, gdje se hidroksilna skupina esterificira s galnom ili elaginskom kiselinom, dajući galotanine ili elagitanine (Ozcan i sur., 2014).

### 2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su fenolni spojevi koji se mogu podijeliti u dvije podskupine: derivati benzojeve kiseline i derivati cimetne kiseline (Tsao, 2010). Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline, nastaju direktno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne u slobodnom obliku, ali dolaze i kao esteri, te konjugirane sa šećerima i drugim organskim kiselinama. Četiri najčešće hidroksibenzojeve kiseline su p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline su derivati cimetne kiseline, rijetko prisutne u slobodnom obliku, najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri. Četiri najčešće hidroksicimetne kiseline su ferulinska, kafeinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina. U usporedbi s hidroksicimetnim kiselinama, hidroksibenzojeve kiseline općenito se nalaze u niskim koncentracijama u crvenom voću, luku, rotkvici itd. (Murković, 2003).

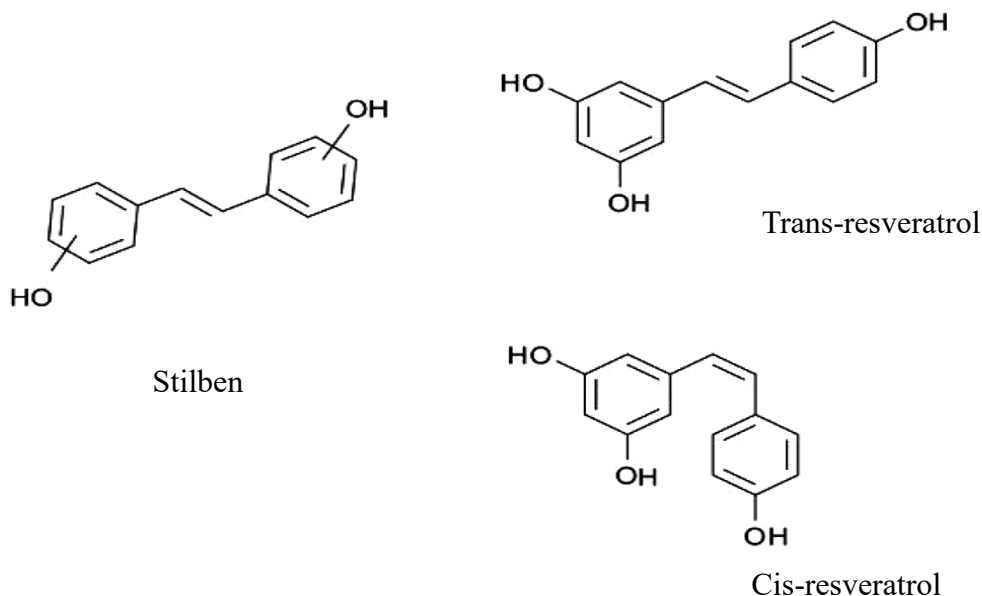


**Slika 4.** Kemijska struktura fenolnih kiselina (Ignat i sur., 2011)

### 2.2.3. Ostali spojevi

Stilbeni (1,2-diarileten) čine skupinu neflavonida koju karakteriziraju dva fenolna ostatka povezana zajedno metilidenskom skupinom s dva ugljika (Slika 5). Stilbeni postoje u oba izomerna oblika *cis* i *trans* konfiguracije (Slika 5) te kao i u slobodnom obliku (manji) i

glikoziliranom obliku (glavni) (Chang i sur., 2005). Jedan od najpoznatijih stilbena je resveratrol (3,5,4'- trihidroksistilben), koji je sastojak biljaka poput grožđa, kikirikija i bobičastog voća (Singla i sur., 2019).



Slika 5. Kemijske strukture stilbena (Singla i sur., 2019)

#### 2.2.4. Polifenolni spojevi u kadulji

Listovi kadulje bogati su izvor polifenolnih spojeva s više od 50 identificiranih polifenola, uključujući razne fenolne kiseline i flavonoide (Sharma i sur., 2020). Neki od važnijih polifenolnih spojeva koji se nalaze u kadulji uključuju kafeinsku kiselinu, ružmarinsku kiselinu, salvianolnu kiselinu, sagekumarin, sagerinsku kiselinu i ferulinsku kiselinu, kao i glavne flavonoide luteolin, apigenin, hispidulin, kemferol i kvercetin (Sharma i sur., 2020). Alkoholni i vodeni ekstrakti *S. officinalis* bogati su flavonoidima, posebice ružmarinskom kiselinom i luteolin-7-glukozidom. Također su pronađene fenolne kiseline kao što su kafeinska kiselina i 3-kafeoil kininska kiselina (neoklorogenska kiselina) u metanolnim ekstraktima (Lima i sur., 2007). Nekoliko flavonoida poput klorogenske kiseline, elaginske kiseline, epikatehina, epigalokatehin galata, kvercetina, ružmarinske kiseline, rutina i luteolin-7-glukozida identificirani su u infuzijama kadulje (Lima i sur., 2005). Ružmarinska kiselina i elaginska kiselina su najviše zastupljeni flavonoidi u infuzijskim ekstraktima *S. officinalis*, nakon čega slijedi rutin, klorogenska kiselina i kvercetin (Hernández-Saavedra i sur., 2016). U istraživanju Dent i sur. (2017) gdje se kao otapalo za ekstrakciju koristio 30% etanol u ekstraktima kadulje detektirano je 15 polifenolnih spojeva među kojima fenolne kiseline

(vanilinska, kafeinska, siringinska, ružmarinska, salvianolne K, I kiseline, metil rozmarinat) te flavonoidi (6-hidroksiluteolin-7-glukozid, luteolin i njihov 7-glukuronid, 3 glukuronid, 7-glukozid; apigenin i njihov 7- glukuronid i 7-glukozid). Kada se kao otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju koristio 80% aceton u ekstraktima kadulje detektirani su: izorhamnetin-3-O-heksozid, kamferol-3-rutinozid, rutin, kvercetin-3-glukozid (flavonoli); epikatehin, galokatehin (flavan-3-oli); apigenin, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-rutinozid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-rutinozid (flavoni); 4-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska kiselina (hidroksibenzojeve kiseline); kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, p-kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina, sagerinska kiselina i salvianolna kiselina (hidroksicimetne kiseline) (Čulina i sur., 2021).

## **2.3 Metode ekstrakcije**

Ekstrakcija biljnog materijala je proces odvajanja različitih bioaktivnih spojeva ili sekundarnih metabolita kao što su alkaloidi, flavonoidi, terpeni, saponini, steroidi i glikozidi iz biljnog materijala korištenjem odgovarajućeg otapala i standardnog postupka ekstrakcije otapalima (Manousi i sur., 2019). U ekstrakciji ljekovitog bilja najčešće se koriste: maceracija, infuzija, dekokcija, perkolacija, digestija, klasična ekstrakcija otapalima, Soxhlet ekstrakcija, , kruto-tekuća ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta enzimima (Jakovljević i sur., 2021; Putnik i sur., 2016; Dent i sur., 2013). Odabir odgovarajuće metode ekstrakcije ovisi o prirodi biljnog materijala, upotrijebljenom otapalu, pH otapala, temperaturi i omjeru otapala u uzorku te također ovisi i o namjeni gotovih proizvoda (Deshmukh Krishi Vidyapeeth i sur., 2017; Sasidharan i sur., 2011; Azwanida NN, 2015).

### **2.3.1 Klasična ekstrakcija otapalima**

Klasična ekstrakcija s otapalima je jedna od metoda koja se najviše primjenjuje za ekstrakciju biljnoga materijala jer je jednostavna, efikasna i široko primjenjiva. Ekstrakcija polifenola je zahtjevnija zbog raznolikosti njihovih kemijskih struktura i njihovih interakcija s drugim komponentama biljnog materijala. Mnogi čimbenici, poput sastava otapala, vremena ekstrakcije, temperature, pH, omjera krutine i tekućine i veličine čestica, mogu značajno utjecati na efikasnost ekstrakcije (Durling i sur., 2007). Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz

biljnog materijala se najčešće koriste vodene otopine polarnih otapala (acetona, metanol, etanol) te voda (Durling i sur., 2007, Dent i sur., 2013, Pachura i sur., 2022). Vodene otopine acetona su dobra otapala za polarne polifenole kao i druge antioksidanse, ali njihova primjena može dovesti do neprihvatljivih razina acetona zaostalog u ekstraktima (Psarrou i sur. 2020). Vodene otopine etanola se čine kao najprikladniji sustav otapala za ekstrakciju polifenola kadulje zbog različitih polariteta bioaktivnih sastojaka te prihvatljivosti ovog sustava otapala za ljudsku prehranu. Pregledom literature nađe se istraživanja koja su provela ekstrakcije kadulje s raznim otapalima. U jednome istraživanju provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kadulje primjenom vodenih otopina etanola (30%, 50% ili 70%), najveća efikasnost ekstrakcije je postignuta primjenom 30 % etanola (Dent i sur., 2013), te 50 % etanola (Durling i sur., 2007). Osmić i sur. (2019) su odredili utjecaj različitih koncentracija metanola (40%, 50% i 60%) kao ekstrakcijskog otapala na konačnu količinu ukupnih polifenola i antioksidativnu aktivnost u ekstraktima kadulje te zaključili da je najveća količina ukupnih polifenola bila u ekstraktu za koji se kao otapalo koristio 60% metanol. U istraživanju Putnik i sur. (2016) su primjenom 30 % acetona odredili optimalnu ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kadulje.

### **2.3.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra se jednom od najučinkovitijih tehnika ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se provodi u ultrazvučnim kupeljima ili uređajima određene snage ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij iz kojeg se ekstrahira. Ultrazvučna ekstrakcija je jedna od metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenti koja pruža visoku razinu prinosa u kratkom vremenu, smanjujući potrošnju energije, topline i otapala (Chemat i sur., 2017). Pomoću ove metode, ekstrakcija se izvodi u plinovitom ili tekućem mediju efektom kavitacije koja se formira na površinama tekućina-tekućina ili plin-tekućina (Chemat i sur., 2017). Kod ove metode na uzorku se primjenjuju akustične vibracije s frekvencijama iznad 20 kHz (Chemat i sur., 2017). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je u novije vrijeme sve više upotrebljavana metoda izolacije polifenolnih spojeva iz biljnog materijala koja se provodi pomoću prijenosa mase koja uzrokuje razgradnju stanične stijenke te olakšava izlazak sadržaja iz unutrašnjosti stanice. Brindsi i sur. (2021) proveli su ekstrakciju polifenola iz kadulje ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (snaga od 130 W, frekvencija 40 kHz u trajanju od 1 h) primjenom metanola i dokazali snažno antioksidacijsko djelovanje ekstrakta. Antioksidativna svojstva mediteranskih začina (jedan od promatranih je i kadulja) u



dobivenim ekstraktima ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (snaga od 340 W, frekvencija 50-60 kHz i vrijeme trajanja 30 min) primjenom heksana, etanola i acetona dokazali su i drugi autori (Cvitković i sur., 2021). Jakovljević i sur. (2021) su ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (snaga od 50 W, frekvencija 37 kHz i u vremenu trajanja od 30, 60 i 90 minuta) primjenom eutektičnih otapala na bazi kolin klorida odredili visoke udjele ružmarinske i karnozinske kiseline iz u ekstraktu kadulje.

### 2.3.3 Ekstrakcija potpomognuta enzimima

Ekstrakcija potpomognuta enzimima je potencijalna alternativa klasičnim metodama ekstrakcije otapalima i dobiva sve više pažnje zbog toga što je učinkovita, bezopasna, održiva i ekološki prihvatljiva ekstrakcijska tehnologija. Ekstrakcija enzimima najčešće se koristi kao predtretman nakon koje slijedi neka druga vrsta ekstrakcije (klasična, Soxhlet, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i sl.) kako bi se povećao prinos eteričnih ulja, polifenola i sl. (Nadar i sur., 2018). Ekstrakcija na bazi enzima ovisi o svojstvu enzima da ubrzavaju reakcije s točnom specifičnošću za određene supstrate, regionalnom selektivnošću i njihovoj sposobnosti provođenja reakcija pod blagim uvjetima bez promijene njihove strukture. Načelo ekstrakcije potpomognute enzimima je razbijanje stanične stijenke biljke reakcijom hidrolize pomoću enzima kao katalizatora pod optimalnim eksperimentalnim uvjetima, kako bi se lakše oslobodile unutarstanične komponente. Stanična stijenka biljke veže se za aktivno mjesto enzima. To uzrokuje promjenu oblika enzima čime supstrat bolje sjeda na svoje aktivno mjesto, uzrokujući tako maksimalnu interakciju između enzima i supstrata. Enzim ubrzava reakciju hidrolize čime se ubrzava razgradnja stanične stijenke, a čime se posljedično oslobađaju sastojci iz stanice (Sheldon i van Pelt, 2013). Kako se ovakve ekstrakcije provode pod kontroliranim temperaturnim uvjetima, vrlo su korisne za ekstrakciju termoosjetljivih molekula kao što su arome, pigmenti, ulja, itd. Radni uvjeti kao što su temperatura reakcije, vrijeme ekstrakcije, pH medija pri kojemu se kemijska reakcija provodi, koncentracija enzima i veličina čestica supstrata ključni su za proces ekstrakcije (M'hiri i sur., 2014). Za ekstrakciju potpomognutu enzimima koristi se širok raspon enzima koji imaju svojstva hidrolize ugljikohidrata. Tako su npr. celulaza i pektinaza korišteni za ekstrahiranje ukupnih polifenola i različitih polifenolnih spojeva (antocijana, antocijanina, flavonola i sl.) iz različitih biljaka kao što su: *Prunus nepalensis L.*, *Ulva americana*, *Allium sativum L.*, *Vitis rotundifolia Michx.*, *Crocus sativus L.*, *Ulmus pumila L.*, *Larix gmelini Rupr.*, *Olea europaea L.* i *Laurus nobilis L.* (Gligor i sur., 2019), ksilanaza je korišten

za ekstrakciju karotenoida iz rajčice (Prokopov i sur., 2017). Ksilanaza, amilaza, papain, pektinaza i hemicelulaza koriste se kao korak predobrade prije ekstrakcije kako bi se maksimalno povećao prinos ekstrakcije (Gligor i sur, 2019). Tako su npr. Miljanović i sur. (2020) promatrali učinak različitih predtretmana na prinos i kemijski sastav eteričnih ulja različitih aromatičnih biljaka (kadulja, lovor i ružmarin). Za jedan od predtretmana koristili su ekstrakciju potpomognutu enzimima gdje su od enzima koristili celulazu, pektinazu i ksilanazu u koncentraciji od 0,02 mg/mL. Istraživači su zaključili da enzimi celulaza, pektinaza i ksilanaza mogu razgraditi njihove supstrate pri korištenim reakcijskim uvjetima. Također, zaključili su da je predtretman s enzimima doveo do većeg prinosa, ali ne i bolje kvalitete eteričnih ulja. Su i sur. (2020) promatrali su učinak različitih enzima na ekstrakciju ružmarinske kiseline iz kadulje. Kao predtretman koristili su pet komercijalnih proteaza (Protamex, Flavourzyme, Chamzyme FP, Papain, i Bromelain) te komercijalnu celulazu (Celulaza A). Enzime su koristili u koncentracijama 2-8 %, kao otapalo za ekstrakciju koristila se voda, a vrijeme trajanja ekstrakcije je bilo od 2-6 h. Istraživači su zaključili kako metodom enzimske ekstrakcije ružmarinske kiseline iz kadulje gdje se kao otapalo koristi voda može efikasno ekstrahirati ružmarinsku kiselinu te je korištena metoda usporediva s klasičnim metodama.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

Korišteni su listići kadulje (*Salvia officinalis* L.) ubrani na području Zagreba u lipnju 2021. godine. Listići su osušeni i uskladišteni, a neposredno prije korištenja u istraživanju su usitnjeni.

#### **3.2 Standardi i kemikalije**

Kemikalije za postupke ekstrakcije

- 96 %-tna vodena otopina etanola; Kemika (Hrvatska)
- 100 %-tni metanol; Kemika (Hrvatska)
- 100 %-tni aceton; Kemika (Hrvatska)
- deionizirana voda

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje

- Folin-Ciocalteu reagens; Kemika (Hrvatska)
- natrijev karbonat, bezvodni; Kemika (Hrvatska)
- standard galne kiseline; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)

Enzimi i kemikalije za enzimsku ekstrakciju

- celulaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)
- pektinaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)
- ksilanaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)
- limunska kiselina monohidrat; Kemika (Hrvatska)
- 2M vodena otopina NaOH

### 3.3 Aparatura i pribor

- analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan )
- UV/VIS Spektrofotometar (Lambda 1, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD)
- magnetska mješalica (MS-H-S, DLAB Scientific, Beijing, Kina )
- vorteks mješalica (Labo Moderne, Paris, Francuska)
- ultrazvučni homogenizator (UP200Ht, Hielscher, Njemačka)
- pH-metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- automatske pipete volumena 2 – 1000  $\mu$ L (KemoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- električni mlinac (GT 1108, Tefal, Bratislava, Slovačka)

### 3.4 Metode rada

Provedena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom iz lista kadulje primjenom otapala (vodene otopine etanol-voda, aceton-voda i metanol-voda, (1:1, v/v)) sa svrhom određivanja optimalnog vremena ekstrakcije koje će se koristiti u nastavku analize. Proveden je predtretman lista kadulje enzimima (različitih koncentracija 0,2-2 mg/mL) u 0,05M citratnom puferu pH=6,5 pri 40 °C tijekom 1 i 4 sata, nakon čega je biljni materijal osušen te je korišten za daljnje analize ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnom vremenu ekstrakcije primjenom otapala (vodene otopine etanol-voda, aceton-voda i metanol-voda, (1:1, v/v)). Iz lista kadulje su nakon predtretmana enzimima, a zatim ultrazvučne ekstrakcije dobiveni

ekstrakti u kojima su potom određivani maseni udjeli ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom.

### 3.4.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je primjenom ultrazvučnog homogenizatora UP200Ht (Hielscher, Njemačka), uz pomoć sonde promjera 14 mm, izlazne nominalne snage ultrazvuka 200 W u trajanju od 5, 10 i 15 minuta. U laboratorijsku čašu od 100 mL odvaže se 1 g usitnjenog biljnog materijala (lista kadulje) i doda 25 mL otapala (vodene otopine etanol-voda, aceton-voda i metanol-voda, (1:1, v/v)). Sadržaj čaše se dobro promiješa pomoću staklenog štapića nakon čega se u nju uroni ultrazvučna sonda. Nakon provedene ekstrakcije, sadržaj se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL koja se dopuni otapalom do oznake te prebaci u označenu plastičnu tubu. Dobiveni ekstrakt se do analize polifenolnih spojeva čuva na  $-18^{\circ}\text{C}$ . Utvrđeno je optimalno vrijeme ultrazvučne ekstrakcije od 5 min.



**Slika 6.** Ultrazvučna ekstrakcija i filtracija ekstrakata (vlastita fotografija)

### 3.4.2 Predtretman enzimima

#### Priprema puferske 0,05M otopine citrata

U čistu laboratorijsku čašu volumena 500 mL odvaže se 4,80 g limunske kiseline, zatim doda 400 mL pročišćene vode te se prenese u odmjernu tikvicu i nadopuni vodom do oznake. Sonda pH-metra uroni se u otopinu te uz postupno dodavanje 2 M otopine NaOH podešava pH

vrijednost otopine do 6,5. Pripremljeni pufer prebaci se u bocu volumena 500 mL te čuva na hladnom i tamnom mjestu.

#### Izvedba enzimskog predtretmana

U papirnoj lađici se odvaže *a)* 5 mg enzima ksilanaze, pektinaze, celulaze te kombinacije svih enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza 1:1:1), *b)* 50 mg enzima ksilanaze, pektinaze, celulaze te kombinacija svih enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza 1:1:1) te se odvagani enzimi prenesu i otope u 25 mL 0,05M citratnog pufera (pH=6,5). Posebno se odvaže 5 g prethodno usitnjenog biljnog materijala (list kadulje) s točnošću  $\pm 0,01$  g u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 mL, te se doda pripremljena otopina enzima u citratnom puferu. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, stavi se grijati u vodenoj kupelji uz konstantno miješanje pri 40 °C u trajanju *a)* od 1 sat te *b)* u trajanju od 4 sata. Po završetku enzimskog predtretmana sadržaj tikvice (list kadulje s dodatkom enzima) se prenese na satno staklo i ostavi sušiti tijekom 24 sata. Osušeni biljni materijal lista kadulje nakon predtretmana enzimima se koristi za daljnju ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom opisanu u nastavku. Radi se i negativna kontrola (bez enzima).

#### **3.4.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom nakon predtretmana enzimima**

Biljni materijal je prethodno tretiran dodatkom različite koncentracije enzima (0,2 ili 2 mg/mL) pri 40 °C tijekom 1, odnosno tijekom 4 sata, nakon čega se prenese na satno staklo i osuši na zraku tijekom 24 sata. U laboratorijsku čašu od 100 mL odvaže se 1 g prethodno tretiranog kadulje i doda 25 mL otapala (vodene otopine etanol-voda, aceton-voda, odnosno metanol-voda, (1:1, v/v)). Sadržaj čaše se dobro promiješa uz pomoć staklenog štapića, nakon čega se uroni ultrazvučna sonda i provodi se ultrazvučna ekstrakcija. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provede se primjenom ultrazvučne sonde promjera 14 mm, izlazne nominalne snage ultrazvuka 200 W u trajanju od 5 minuta. Nakon provedene ekstrakcije, sadržaj se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL, koja se dopuni otapalom do oznake te se sadržaj prebaci u označenu tubu. Dobiveni ekstrakt se do analize polifenolnih spojeva čuva na -18 °C.

#### **3.4.4. Određivanje ukupnih polifenola**

Za određivanje ukupnih fenola koristi se spektrofotometrijska metoda temeljena na reakciji obojenja fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri valnoj

duljini od 765 nm (Ainsworth i Gillespie, 2007). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plave boje. Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Alves i sur.,2014).

Kemikalije i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)  
F.C. reagens se razrijedi deioniziranom vodom 1:2
- zasićena otopina natrijeva karbonata  
Priprema: 200g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici do 1000 mL i nakon 24 h profiltrira.
- standard galne kiseline  
Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje, te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni etanolom.

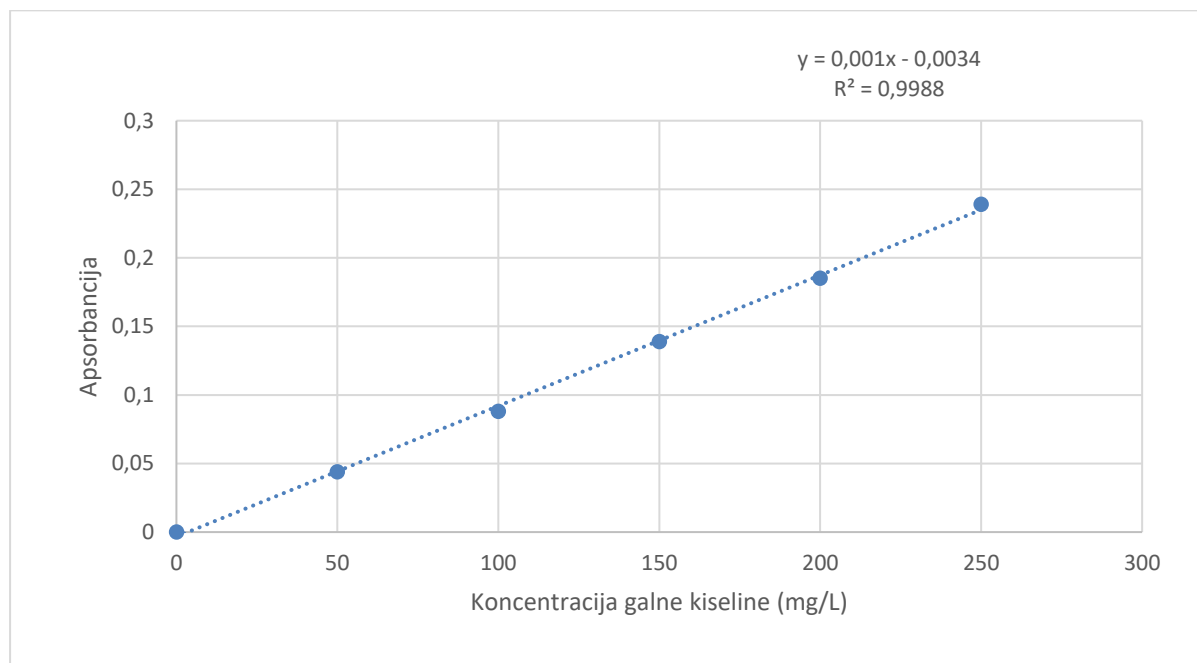
#### Postupak određivanja ukupnih polifenola

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 125  $\mu$ L ekstrakta lista, 625  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 10 mL demineralizirane vode. Nakon 3 minute doda se 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se sve skupa promiješa pomoću vorteks mješalice. potom se griju u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C tijekom 25 minuta. Nakon toga se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

#### Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 500 mg galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL, te nadopuni etanolom do oznake. Od dobivene matične otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 4 i 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu kako bi masena koncentracija galne kiseline u tim tikvicama iznosila 50, 100, 150, 200

i 250 mg/L. Nakon toga se iz svake tikvice otpipetira 125  $\mu$ L otopine standarda te se napravi isti prethodno opisani postupak za određivanje ukupnih fenola. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija iscrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L) uz pomoć programa Microsoft Excel, pri čemu se na apscisi navedu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.



**Slika 7.** Baždarni dijagram galne kiseline

### 3.5 Statistička obrada

U statističkoj obradi rezultata određenih masenih udjela ukupnih polifenola korišteni su programi Microsoft Excel i web alat Astatsa (<https://astatsa.com/>), pomoću kojih se napravila statistička obrada podataka. Glavni parametar koji se koristio te preko kojega se provjeravalo ~~ako~~ ima li promjena nekog drugog parametra u procesu ekstrakcije statistički značajan utjecaj je maseni udio ukupnih polifenola. Statistička značajnost različitih procesnih parametara određena je analizom varijance (ANOVA), a izražena je preko vjerojatnosti za dobivanje uočenih vrijednosti (p-vrijednosti,  $p \leq 0,05$ ; 95 %-tna razina signifikantnosti).

Tukeyev test pokazuje značajnost utjecaja jedne grupe u usporedbi s drugom grupom kako bi se s 95 %-tnom značajnošću utvrdilo koji od promatranih parametara ima najizraženiji utjecaj na maseni udio ukupnih polifenola u ekstraktima lista kadulje.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1 Određivanje optimalnog vremena ultrazvučne ekstrakcije

Rezultati određivanja količine ukupnih izoliranih polifenola iz lista kadulje u ovisnosti o vremenu trajanja ultrazvučne ekstrakcije dani su u Tablici 2. Vidljivo je da se maseni udjeli ukupnih polifenola nalaze u rasponu od 25,71 do 42,48 mg GAE/g, ovisno o ekstrakcijskom otapalu i vremenu trajanja ekstrakcije. Najveći maseni udio izoliranih ukupnih polifenolnih spojeva od 42,48 mg GAE /g suhog lista kadulje je dobiven ekstrakcijom vodenom otopinom etanola (1:1, v/v) pri vremenu ekstrakcije od 5 minuta. Primjenom vodenih otopina metanola (1:1, v/v) i acetona (1:1, v/v) dobivene su tek nešto niže vrijednosti oko 35 mg GAE /g suhog lista kadulje. Daljnjim povećanjem vremena ekstrakcije na 10 i 15 minuta ne dobivaju se veći maseni udjeli polifenolnih spojeva, već se maseni udjeli smanjuju. Napravljena je statistička obrada rezultata (ANOVA test) (Tablica 3) te nije utvrđena statistički značajna razlika između različitih vremena ekstrakcije, ali razmatrajući dobivene rezultate iz Tablice 2 vidljivo je da je najpovoljnije vrijeme ekstrakcije od 5 minuta. To je vrijeme ekstrakcije korišteno u daljnjem istraživanju.

**Tablica 2.** Rezultati određivanja ukupnih izoliranih polifenola u ovisnosti o vremenu trajanja ultrazvučne ekstrakcije

Otapalo	Vrijeme ekstrakcije	w (mg GAE/g) ± SD
etanol-voda (1:1)	5 minuta	42,48±14,48
	10 minuta	33,77±8.64
	15 minuta	40,80±13,85
metanol-voda (1:1)	5 minuta	35,68±4,34
	10 minuta	25,71±7,59
	15 minuta	9,79±0,44
aceton-voda (1:1)	5 minuta	35,37±4,61
	10 minuta	42,19±0,24



	15 minuta	29,67±2,91
--	-----------	------------

**Tablica 3.** Anova test za različita vremena (5, 10, 15 min) ekstrakcije ukupnih polifenola

ANOVA						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-vrijednost	F crit
Između različitih vremena	189,5699	2	94,78495	0,859369	0,469693715	5,143253
U pojedinom vremenu	661,7757	6	110,2959			
Ukupno	851,3456	8				

#### 4.2. Utjecaj enzimskog predtretmana i ekstrakcije potpomognute enzimima na ukupne izolirane polifenolne spojeve iz lista kadulje

U nastavku istraživanja se istraživalo kako predtretman (prije ultrazvučne ekstrakcije) s enzimima ksilanazom, celulazom, pektinazom i njihovom kombinacijom utječe na maseni udio izoliranih polifenolnih spojeva kadulje. Rezultati istraživanja su prikazani u tablicama za svako otapalo (Tablice 4, 5 i 6). U Tablici 4 prikazani su rezultati za otapalo etanol-voda (1:1) te se iz njih može vidjeti da je najveća maseni udio polifenola od 18,35 mg GAE/g određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila pektinaza u koncentraciji od 2 mg/mL, te je predtretman trajao 4 h. Najmanji maseni udio polifenola od 3,11 mg GAE/g je određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila ksilanaza u koncentraciji od 2 mg/mL, te je predtreman trajao 1 h. Iz rezultata u Tablici 4 može se zaključiti da je dulje vrijeme trajanja predtretmana od 4 h u pravilu rezultiralo većim masenim udjelima izoliranih polifenola u uzorcima, osim za uzorke gdje se za predtretman koristila kombinacija enzima. U tim uzorcima vrijeme trajanja predtretmana od 1 h je rezultiralo većim masenim udjelima izoliranih ukupnih polifenola.

**Tablica 4.** Rezultati određivanja ukupnih izoliranih polifenola nakon predtretmana s enzimima uz otapalo etanol-voda (1:1)

Enzim	Pektinaza			
	1		4	
Vrijeme predtretmana / (h)				
Koncentracija enzima/(mg/mL)	0,2	2	0,2	2
Ukupni polifenoli/	7,52±0,41	9,99±0,39	13,20±1,82	18,35±0,37

<b>(mg GAE/g suhe biljke) ± SD</b>				
<b>Enzim</b>	<b>Celulaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke) ± SD</b>	6,81±0,58	9,58±1,02	7,26±0,40	9,98±0,28
<b>Enzim</b>	<b>Ksilanaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke) ± SD</b>	4,58±0,51	3,11±0,95	14,75±0,21	9,16±0,02
<b>Enzim</b>	<b>Pektinaza, celulaza, ksilanaza (1:1:1)</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke) ± SD</b>	13,78±1,55	12,60±0,80	5,18±0,44	7,92±0,53

U Tablici 5 prikazani su rezultati za ekstrakciju uz otapalo metanol-voda (1:1), te se iz njih može vidjeti da je najveći maseni udio izoliranih ukupnih polifenola od 19,72 mg GAE/g određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila pektinaza u koncentraciji od 2 mg/mL, te je predtretman trajao 4 h. Najmanji maseni udio dobivenih ukupnih polifenola od 6,23 mg GAE/g je određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila ksilanaza u koncentraciji od 0,2

mg/mL, te je predtretman trajao 1 h. Iz prikaza rezultata u Tablici 5 može se zaključiti da veća koncentracija enzima od 2 mg/mL u pravilu rezultira većim masenim udjelima izoliranih ukupnih polifenola u ekstraktima lista kadulje. To pravilo vrijedi za sve uzorke, osim za one sa ksilanazom gdje je uzorak u kojem je koncentracija enzima bila 0,2 mg/mL i predtretman je trajao 4 sata imao najveći zabilježeni maseni udio ukupnih izoliranih polifenola u odnosu na ostale uzorke sa ksilanazom. Predtretman kombinacijom enzima, gdje je koncentracija enzima iznosila 0,2 mg/mL i predtretman je trajao 1 h, rezultirao je najvećim masenim udjelom ukupnih polifenola u odnosu na ostale uzorke gdje se koristila kombinacija enzima za predtretman.

**Tablica 5.** Rezultati određivanja ukupnih izoliranih fenola nakon predtretmana s enzimima za otapalo metanol-voda (1:1)

<b>Enzim</b>	<b>Pektinaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	11,07±0,34	12,17±0,63	15,84±0,27	19,79±2,10
<b>Enzim</b>	<b>Celulaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	8,09±0,49	16,85±1,20	9,23±0,00	10,00±0,28
<b>Enzim</b>	<b>Ksilanaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>
<b>Ukupni polifenoli / (mg GAE/g suhe biljke)</b>	6,23±0,19	7,42±0,21	12,24±0,30	6,66±0,41

<b>Enzim</b>	<b>Pektinaza, celulaza, ksilanaza (1:1:1)</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	12,92±0,53	12,41±0,71	6,87±0,21	12,78±0,42

U Tablici 6 prikazani su rezultati za ekstrakciju uz otapalo aceton-voda (1:1), te se iz njih može vidjeti da je najveći maseni udio izoliranih polifenola od 15,26 mg GAE/g određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila pektinaza u koncentraciji od 2 mg/mL, te je predtretman trajao 4 h. Najmanji maseni udio ukupnih izoliranih polifenola od 2,97 mg GAE/g je određen u uzorku za koji se u predtretmanu koristila kombinacija enzima u koncentraciji od 0,2 mg/mL, te je predtretman trajao 4 h. Rezultati iz Tablice 6 ukazuju da različita vremena trajanja predtretmana rezultiraju različitim masenim udjelima ukupnih izoliranih polifenola uz različite enzime. Tako je na primjer duže vrijeme trajanja predtretmana od 4 h rezultiralo većim masenim udjelima ukupnih izoliranih polifenola kada su se koristili enzimi pektinaza i ksilanaza. S druge strane kada se za predtretman koristila celulaza ili kombinacija enzima onda su veći maseni udjeli ukupnih izoliranih polifenola određeni kod uzoraka gdje je predtretman trajao 1 h. Također, iz rezultata u Tablici 6 može se zaključiti da veća koncentracija enzima od 2 mg/mL u pravilu rezultira većim masenim udjelima ukupnih izoliranih polifenola u uzorcima. To pravilo vrijedi za sve uzorke osim onih gdje se koristila ksilanaza, u čemu je uzorak u kojem je koncentracija enzima bila 0,2 mg/mL i predtretman je trajao 4 sata imao najveći maseni udio izoliranih ukupnih polifenola naspram ostalih uzoraka sa ksilanazom. Sličan slučaj se može primijetiti i na uzorku gdje se u predtretmanu koristila kombinacija enzima, pri čemu je uzorak gdje je koncentracija enzima iznosila 0,2 mg/mL i predtretman je trajao 1 h imao veći maseni udio ukupnih izoliranih polifenola u odnosu na uzorak gdje je koncentracija enzima bila veća a vrijeme predtretmana jednako, te u odnosu na uzorak gdje je vrijeme predtretmana bilo dulje a koncentracija enzima jednaka.

**Tablica 6.** Rezultati određivanja ukupnih izoliranih fenola nakon predtretmana s enzimima za otapalo aceton-voda (1:1)

<b>Enzim</b>	<b>Pektinaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	1		4	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	5,71±0,28	10,54±1,91	14,95±1,32	15,26±0,16
<b>Enzim</b>	<b>Celulaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	1		4	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	10,45±0,72	10,46±0,34	8,58±0,67	12,08±0,64
<b>Enzim</b>	<b>Ksilanaza</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	1		4	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	3,02±0,46	5,08±0,28	8,47±0,11	6,27±0,71
<b>Enzim</b>	<b>Pektinaza, celulaza, ksilanaza (1:1:1)</b>			
<b>Vrijeme predtretmana / (h)</b>	1		4	
<b>Koncentracija enzima/(mg/mL)</b>	0,2	2	0,2	2
<b>Ukupni polifenoli/ (mg GAE/g suhe biljke)</b>	13,50±0,41	11,40±,92	2,97±0,89	13,71±0,42

Rezultati su dalje analizirani po otapalima gdje se uspoređivala razlika između jednoga enzima u usporedbi s drugima. Za svako otapalo napravljen je analiza varijance (ANOVA test) te post hoc Tukeyev test.

**Tablica 7.** p- vrijednosti analize varijance u ovisnosti o otapalu

Otapalo	p-vrijednost
Etanol	0,013175302
Metanol	1,03287E-05
Aceton	5,91E-05

Rezultati iz Tablice 7 pokazuju kako primjena odgovarajućeg vodenih otopina otapala (etanol, metanol, aceton, 1:1, v/v) statistički značajno utječe na maseni udio ukupnih izoliranih polifenola iz lista kadulje ( $p < 0.05$ ) pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom i s enzimskim predtretmanom.

**Tablica 8.** p-vrijednosti Tukeyevog testa po otapalima

Otapalo	Enzimi	p-vrijednost
etanol	ksilanaza – celulaza	0,8999947
	ksilanaza – pektinaza	0,0153051
	ksilanaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,5101925
	celulaza – pektinaza	0,0379765
	celulaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,7006148
	pektinaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,3281172
metanol	ksilanaza – celulaza	0,0020099
	ksilanaza – pektinaza	0,0010053
	ksilanaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,0020164
	celulaza – pektinaza	0,7335101
	celulaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,8999947
	pektinaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,7331136

<b>aceton</b>	ksilanaza – celulaza	0,0020099
	ksilanaza – pektinaza	0,0010053
	ksilanaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,0020164
	celulaza–pektinaza	0,7335101
	celulaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,8999947
	pektinaza – (ksilanaza-celulaza-pektinaza)	0,7331136

U Tablici 8 su prikazani rezultati Tukeyevog testa kojim su određeni utjecaji primijenjenih enzima (ksilanaza, celulaza, pektinaza, te kombinacija enzima, 1:1:1) za sva tri otapala (etanol-voda, aceton-voda, metanol-voda, 1:1, v/v). Primjenom otapala etanol-voda nakon predtretmana enzimima određena je statistički značajna razlika u odabiru enzima. Provedeni predtretmanom pektinazom u odnosu na ksilanazu i celulazu te provedenoj ultrazvučnoj ekstrakciji u otapalu etanol-voda doprinosi statistički značajnoj razlici izolacije ukupnih polifenolnih spojeva kadulje ( $p=0,0153051$ ). U usporedbi s tim, upotreba kombinacije enzima (ksilanaza-celulaza-pektinaza) ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na primjenu zasebnih enzima. Primjenom otapala metanol-voda pri provedbi ultrazvučne ekstrakcije nakon predtretmana pektinazom također se dobiju veći maseni udjeli izoliranih polifenolnih spojeva u odnosu na primjenu drugih enzima (celulaza i ksilanaza, te kombinacija enzima, što sugerira da primjena pektinaze značajno utječe na rezultat provedenog predtretmana ( $p= 0.0214345$ ). Također, primjenom otapala aceton-voda postoje značajne razlike u odabiru enzima za predtretman ultrazvučnoj ekstrakciji. Primjena enzima pektinaze, celulaže te kombinacije enzima pokazuje statistički značajnu razliku na maseni udio ukupnih izoliranih polifenolnih spojeva u odnosu na upotrebu ksilanaze (tablica 8).

Usporedimo li rezultate sličnih istraživanja može se zaključiti da predtretman enzimima, naročito pektinazom, doprinosi značajnom povećanju količine polifenolnih spojeva izoliranih iz biljnog materijala. Primjena enzima pektinaze pri enzimskoj ekstrakciji značajnijoj mjeri doprinosi povećanju udjela proantocijanidina iz sjemenki i kožice grožđa u u odnosu na celulazu i tanazu (Fernández i sur., 2015). Također, Pinelo i sur. (2008) su dobili veće udjele polifenolnih spojeva u ekstraktima jabuke primjenom enzima pektinaze u odnosu na primjenu

celulaze i proteaza. Pontillo i suradnici (2021) su usporedili konvencionalnu ekstrakciju i ekstrakciju enzimima na biljci ružmarina (*Rosmarinus officinalis L.*). Kao otapalo za ekstrakciju koristili su 50% etanol, a za predtretman s enzimima koristili su pet komercijalnih enzimskih smjesa (Alcalase 2.4L FG, Cellic CTec2, Viscozyme L, Cellic HTec2 i Bioprep 3000L). Zaključili su da je predtretman s enzimima doveo do jačeg oslobađanja polifenolnih spojeva te povećanja efikasnosti procesa za 30%, a do najvećeg zabilježenog masenog udjela ukupnih polifenola u ekstraktu ( $15.2 \pm 0.3$  mgGAE/g ružmarina) doveo je predtretman s enzimom Bioprep 3000L (pektinaza). To je u skladu s rezultatima našeg istraživanja gdje je predtretman s pektinazom doveo do najvišeg masenog udjela ukupnih izoliranih polifenola u ekstraktima ( $19,79 \pm 2,10$  mgGAE/g). Pretretman enzimima se vrlo često provodi neposredno prije vodene destilacije biljnog materijala u cilju povećanja udjela izoliranog eteričnog ulja (Miljanović i sur., 2020; Bolulila i sur., 2015). Ultrazvučna ekstrakcija se provodi kako bi se ekstrakcija ubrzala, povećali prinosi te povećali udjeli ukupnih polifenola u ekstraktima u usporedbi s konvencionalnim metodama (Horžić i sur., 2012; Brindsi i sur., 2021; Cvitković i sur., 2021) pa su tako Dent i suradnici (2015) proveli istraživanje u kojem su usporedili ultrazvučnu i konvencionalnu ekstrakciju polifenola iz biljke kadulje, te zaključili da je ultrazvučna ekstrakcija rezultirala s 20% više ukupnih polifenola u ekstraktima. Također, u tome istraživanju najveći maseni udio polifenolnih spojeva je zabilježen u uzorcima s etanolom (6775.52 mg RA/100 g). To se podudara s rezultatima našega istraživanja gdje je najveći maseni udio ukupnih polifenola također zabilježen u uzorku s etanolom (42,48 mg GAE/g). Do sličnoga zaključka su došli Dent i sur. (2013) gdje je u ekstraktima kadulje najveći maseni udio ukupnih izoliranih polifenola zabilježen u uzorku s etanolom (6278.12 mg GAE/g). Horžić i sur. (2012) su proveli istraživanje gdje se uspoređivalo ultrazvučnu i konvencionalu ekstrakciju iz biljke *Camelia sinensis*, a kao otapala za ekstrakciju su koristili 75% etanol i vodu. Zaključili su da je ultrazvučna ekstrakcija s 75% etanolom dovela do najveće zabilježene masene koncentracije izoliranih polifenola (2957.73 mg/L). Putnik i suradnici su za ekstrakciju polifenola iz kadulje koristili otapala 30% etanol i aceton, te su zaključili da je najveći maseni udio ukupnih polifenola (9059.66 mg GAE/100 g) zabilježen u uzorku s acetonom pri vremenu trajanja ekstrakcije od 10 minuta. To je u skladu s rezultatima i ovoga istraživanja jer je za vrijeme trajanja ekstrakcije od 10 minuta najveći maseni udio ukupnih polifenola (42,19 mg GAE/g) zabilježen kada se koristio aceton kao otapalo.



Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da predtretman enzimima ima povoljan učinak na maseni udio ukupnih izoliranih polifenola u ekstraktima lista kadulje, pogotovo ako se u predtretmanu koristi pektinaza. Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se kao jednostavna i efikasna metoda ekstrakcije ukupnih polifenola iz lista kadulje. Kao najpovoljnije otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju pokazala se vodena otopina etanola (1:1,v/v) jer je najveći maseni udio ukupnih izoliranih polifenola zabilježen kada se kao otapalo koristio etanol. Najpovoljnije vrijeme ekstrakcije bilo je 5 minuta, najveći maseni udjeli zabilježeni kod dva otapala kad je vrijeme ekstrakcije bilo 5 minuta, a daljnjim povećanjem vremena ekstrakcije nije došlo do značajnog povećanja udjela izoliranih polifenolnih spojeva.

## 5. Zaključci

Na temelju provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Ljekovita ili dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis L.*) je široko rasprostranjena biljka na našem području te je dobar izvor polifenolnih spojeva koji su određeni spektrofotometrijskom metodom.
2. Maseni udjel ukupnih polifenola u ekstraktima samo djelomično ovisi o vremenu trajanja ultrazvučne ekstrakcije te generalno, produženjem vremena ekstrakcije od 5 minuta na 15 minuta ne dolazi do značajnog povećanja masenog udjela polifenolnih spojeva.
3. Predtretman s enzimima (pektinaza, celulaza, ksilanaza, te kombinacija enzima) prije ultrazvučne ekstrakcije daje bolje rezultate (veći maseni udjeli ukupnih polifenola u ekstraktima) nego ultrazvučna ekstrakcija bez predtretmana, te se vidi trend da veća koncentracija enzima i duže vrijeme trajanje ekstrakcije rezultira većim masenim udjelima ukupnih polifenola u ekstraktima.
4. Predtretman s enzimom pektinazom daje statistički značajno bolje rezultate (veći maseni udio polifenola u ekstraktima) u usporedbi s ksilanazom i celulazom primjenom vodene otopine etanola (1:1), primjenom vodene otopine metanola (1:1) predtretman s pektinazom daje bolje rezultate u usporedbi s ksilanazom, celulazom i kombinacijom enzima te primjenom vodene otopine acetona (1:1) predtretmanu s pektinazom daje bolje rezultate u odnosu na ksilanazu.
5. Najveći maseni udjeli ukupnih polifenola su određeni nakon predtretmana pektinazom te uz ultrazvučnu ekstrakciju u vodenoj otopinom metanola (1:1, v/v).

## 6. POPIS LITERATURE

1. Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* **2**, 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
2. Altindal D, Altindal N (2015) Sage (*Salvia officinalis*) Oils. In: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier, str. 715–721.
3. Alves J, Antonio L, Alves Da Costa M, Reis Da Silva SJ, Flach A Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Sci Technol, Campinas* **34**, 69–73. <https://www.scielo.br/j/cta/a/qPcdGM4DpjD-sjFxfjw33PxDf/?lang=en&format=pdf>
4. Arica V, Arica S, Tutanç M, Motor S, Motor VK, Doğan M (2012) Convulsion in infants as a result of oral use of garden sage. *Turk Pediatri Arsivi* **47**, 70–71. <https://doi.org/10.4274/tpa.1170>
5. Azwanida NN (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* **4**. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
6. Boulila A, Hassen I, Haouar L, Mejri F, Amor IB, Casabianca H i sur. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind. Crop. Prod.* **74**, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.050>
7. Brindisi M, Bouzidi C, Frattaruolo L, Loizzo MR, Cappello MS, Dugay A i sur. (2021) New Insights into the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Italian *Salvia officinalis* Leaf and Flower Extracts in Lipopolysaccharide and Tumor-Mediated Inflammation Models. *Antioxidants*, **10**, 311. <https://doi.org/10.3390/antiox10020311>
8. Cenić-Milošević D, Tambur Z, Bokonjić D, Ivančajić S, Stanojković T, Grozdanić N, i sur. (2013) Antiproliferative effects of some medicinal plants on hela cells. *Archives of Biological Sciences* **65**, 65–70. <https://doi.org/10.2298/ABS1301065M>
9. Chang J, Reiner J, Xie J (2005) Progress on the chemistry of dibenzocyclooctadiene lignans. *Chemical Reviews* **105**, 4581–4609. <https://doi.org/10.1021/cr050531b>
10. Charchari S, Chafaa I, Kassoussi K, Zekri MM, Benhalla A, Boudina N (2010) Glandular trichomes, secretory cavities and essential oil of sage (*salvia officinalis*

- L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* **13**, 267–274.  
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643821>
11. Chemat F, Rombaut N, Sicaire A, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A, Abert-Vian M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **34**, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
  12. Cvitković D, Lisica P, Zorić Z, Repajić M, Pedisić S, Dragović-Uzelac V i sur. (2021) Composition and Antioxidant Properties of Pigments of Mediterranean Herbs and Spices as Affected by Different Extraction Methods. *Foods* **10**, 2477.  
<https://doi.org/10.3390/foods1010247>
  13. Čulina P, Cvitković D, Pfeifer D, Zorić Z, Repajić M, Elez Garofulić i sur. (2021) Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Selected Medicinal and Aromatic Plants: Diversity upon Plant Species and Extraction Technique. *Processes* **9**, 2207.  
<https://doi.org/10.3390/pr9122207>
  14. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313–7352.  
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
  15. de Oliveira LDL, de Carvalho MV, Melo L (2014) Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres* **61**, 764–779.  
<https://doi.org/10.1590/0034-737X201461000002>
  16. Dehghan-Shoar Z, Hardacre AK, Meerdink G, Brennan CS (2011) Lycopene extraction from extruded products containing tomato skin. *International Journal of Food Science and Technology* **46**, 365–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02491.x>
  17. Dent M, Brncic M, Bosiljkov T (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology* **51**, 84-91. <https://hrcak.srce.hr/99751>
  18. Dent M, Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Bosiljkov T, Ježek D, Brnčić M (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **29**, 475-484.  
<https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2168>

19. Dent M, Kovačević DB, Bosiljkov T, Dragović-Uzelac V (2017) Polyphenolic composition and antioxidant capacity of indigenous wild dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Croatica Chemica Acta* **90**, 451–459. <https://doi.org/10.5562/cca3231>
20. Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **6**, 32-36. <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue1/PartA/6-1-23-924.pdf>
21. Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, i sur. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* **101**, 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.050>
22. Ezema CA, Ezeorba TPC, Aguchem RN, Okagu IU (2022) Therapeutic benefits of *Salvia* species: A focus on cancer and viral infection. *Heliyon* **8**, E08763. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08763>
23. Fernández K, Vega M, Aspé E (2015) An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry* **168**, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.021>
24. Ghorbani A, Esmaeilizadeh M (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **7**, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
25. Gligor O, Mocan A, Moldovan C, Locatelli M, Crişan G, Ferreira IC (2019) Enzyme-assisted extractions of polyphenols – a comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology* **88**, 302-315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029>
26. Grdiša M, Jug-Dujaković M, Lončarić M, Carović-Stanko K, Ninčević T, Liber Z, i sur. (2015) Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *Croatica Chemica Acta* **80**, 69-78. <https://hrcak.srce.hr/151149>
27. Hao DC, Gu X-J, Xiao PG (2015) Phytochemical and biological research of *Salvia* medicinal resources. In: *Medicinal Plants*. Elsevier, str. 587–639.
28. Hernández-Saavedra D, Pérez-Ramírez IF, Ramos-Gómez M, Mendoza-Díaz S, Lórcara-Piña G, Reynoso-Camacho R (2016) Phytochemical characterization and effect

- of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medicinal Chemistry Research* **25**, 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1454-1>
29. Horžić D, Jambrak AR, Belščak-Cvitanović A, Komes D, Lelas V (2012) Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts. *Food and Bioprocess Technology*, **5**, 2858–2870. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0791-z>
  30. Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**, 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
  31. Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, i sur. (2019) Bioactive profile of various *salvia officinalis* L. Preparations, *Plants* **8**, 55. <https://doi.org/10.3390/plants8030055>
  32. Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jerković I (2021) Application of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) with Response Surface Methodology Optimization. *Plants* **10**, 80. <https://doi.org/10.3390/plants10010080>
  33. Kurtagić, H. (2017) Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti* **6**, 28–35. <https://hrcak.srce.hr/182928>
  34. Lattanzio V (2013) Phenolic compounds: Introduction. In: *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, str. 1543–1580.
  35. Lima CF, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2005) The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **97**, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.029>
  36. Lima CF, Valentao PCR, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2007) Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* **167**, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
  37. Manousi N, Sarakatsianos I, Samanidou V (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants.

- Engineering Tools in the Beverage Industry*, 283–314.  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X>
38. M'hiri N, Ioannou I, Ghoul M, Boudhrioua NM (2014) Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. *Food Reviews International* **30**, 265–290.  
<http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2014.924139>
39. Miljanović A, Bielen A, Grbin D, Marijanović Z, Andlar M, Rezić T i sur. (2020). Effect of Enzymatic, Ultrasound, and Reflux Extraction Pretreatments on the Chemical Composition of Essential Oils. *Molecules*, **25**, 4818. <https://doi.org/10.3390/molecules25204818>
40. Murković, M. (2003) Phenolic compounds. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Academic press, Oxford, str. 4507-4513. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00914-7>
41. Nadar SS, Rao P, Rathod VK. (2018) Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International* **108**, 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
42. Obulesu M, Rao DM ( Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* **2**, 56-61.  
<https://doi.org/10.4103/0976-3147.80102>
43. Osmić S, Begić S, Mičić V, Petrović Z, Avdić G (2019) Effect of solvent and extraction condition on antioxidative activity of sage (*Salvia Officinalis L.*) extracts obtained by maceration, *Technologica Acta* **11**, 1–8. <https://hrcak.srce.hr/file/317030>
44. Ozcan T, Akpinar-Bayazit A, Yilmaz-Ersan L, Delikanli B (2014) Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **5**, 393–396. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2014.v5.416>
45. Pachura N, Zimmer A, Grzywna K, Figiel A, Szumny A, Łyczko J (2022) Chemical investigation on *Salvia officinalis L.* Affected by multiple drying techniques - The comprehensive analytical approach (HS-SPME, GC-MS, LC-MS/MS, GC-O and NMR). *Food Chem* **15**;397:133802. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133802>
46. Pinelo M, Zornoza B, Meyer AS (2008) Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology* **63**, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.07.007>

47. Pontillo ARN, Papakosta-Tsigkri L, Lymperopoulou T, Mamma D, Kekos D, Detsi A (2021) Conventional and Enzyme-Assisted Extraction of Rosemary Leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Toward a Greener Approach to High Added-Value Extracts. *Applied Sciences* **11**, 3724. <https://doi.org/10.3390/app11083724>
48. Prokopov T, Nikolova M, Dobrev G, Taneva D (2017) Enzyme-assisted extraction of carotenoids from tomato peels. *Acta Alimentaria* **46**, 84–91. <https://doi.org/10.1556/066.2017.46.1.11>
49. Psarrou I, Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V (2020) Extraction Kinetics of Phenolic Antioxidants from the Hydro Distillation Residues of Rosemary and Effect of Pretreatment and Extraction Parameters. *Molecules* **25**, 4520. <https://doi.org/10.3390/molecules25194520>
50. Putnik P, Kovačević DB, Penić M, Fegeš M, Dragović-Uzelac V (2016) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Analytical Methods* **9**, 2385–2394. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0428-3>
51. Reis Giada M de L (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. in J. A. Morales-González (ed.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, IntechOpen, London, str. 87-112. [10.5772/51687](https://doi.org/10.5772/51687).
52. Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfino S, Cardile V, et al. (2013) Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology* **55**, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.036>
53. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY (2011) Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts, *Afr J Tradit Complement Altern Med.* **8**, 1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/?report=classic>
54. Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews* **42**, 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>



55. Sowbhagya HB, Chitra VN (2010) Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50**, 146–161. <https://doi.org/10.1080/10408390802248775>
56. Su C, Pham TTT, Cheng H (2020) Aqueous enzymatic extraction of rosmarinic acid from *Salvia officinalis* : optimisation using response surface methodology. *Phytochemical Analysis*, 1-8. <https://doi.org/10.1002/pca.2922>
57. Tober C, Schoop R (2019) Modulation of neurological pathways by *Salvia officinalis* and its dependence on manufacturing process and plant parts used. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **19**. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2549-x>
58. Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/2Fnu2121231>
59. Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Štefan MB, Babac (2012) Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health, in V. Rao (ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, IntechOpen, London. 10.5772/27843.

## Izjava o izvornosti

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

Alen Supićić  
Vlastoručni potpis