

Bioaktivni potencijal lista odabranog bobičastog voća

Lovrinović, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:993255>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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



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

Nina Lovrinović
0058215014

Bioaktivni potencijal lista odabranog bobičastog voća
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Osvježavajuća bezalkoholna pića

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Bioaktivni potencijal lista odabranog bobičastog voća

Nina Lovrinović, 0058215014

Sažetak: Bobičasto voće važna je sirovina prehrambene industrije te se konzumira u velikim količinama zbog svojih dobrotvornih učinaka na ljudsko zdravlje. Kao posljedica industrijske prerade bobičastog voća, lišće zaostaje kao biljni otpad. Prema brojnim istraživanjima, lišće bobičastog voća bogato je bioaktivnim molekulama, posebice polifenolima, koji dokazano imaju antioksidacijsko i protuupalno djelovanje. Cilj ovog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola u uzorcima lista odabranog bobičastog voća te antioksidacijski kapacitet FRAP i DPPH metodom. Prema dobivenim rezultatima, najviši udio ukupnih fenola određen je u listu brusnice, dok je najniži udio određen u listu crnog dudu. Kod obiju metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta (FRAP i DPPH), najniže vrijednosti dobivene su za uzorak lista crnog dudu, a najviše vrijednosti dobivene su za uzorak lista brusnice FRAP metodom i za uzorak lista kupine DPPH metodom.

Ključne riječi: list bobičastog voća, polifenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet, FRAP, DPPH

Rad sadrži: 33 stranice, 8 slika, 0 tablica, 40 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: Ena Cegledi, mag. ing. techn. aliment.

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Bioactive potential of selected berry leaves

Nina Lovrinović, 0058215014

Abstract: Berries represent an important raw material in the food industry and are consumed in large quantities due to their beneficial effects on human health. As a result of berries industrial processing, leaves are produced as a plant waste. According to numerous studies, berry leaves are rich in bioactive molecules, especially polyphenolics, which are proven to have antioxidant and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to determine the content of total phenols in leaf samples of selected berries and antioxidant capacity using FRAP and DPPH methods. According to the results, the highest total phenols content was determined in cranberry leaf, while black mulberry leaf contained the lowest content of total phenols. The lowest antioxidant capacity values were determined in black mulberry leaf using both methods (FRAP and DPPH), while the highest values were determined in cranberry leaf with FRAP method and in blackberry leaf with DPPH method.

Keywords: berry leaves, polyphenol compounds, antioxidant capacity, FRAP, DPPH

Thesis contains: 33 pages, 8 figures, 0 tables, 40 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Maja Repajić, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance: Ena Cegledi, MSc.

Thesis defended: September 8, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Otpad bobičastog voća.....	2
2.2. Kemijski sastav lista odabranog bobičastog voća.....	4
2.2.1. List borovnice	6
2.2.2. List brusnice.....	6
2.2.3. List crnog duda	7
2.2.4. List šumske jagode.....	8
2.2.5. List kupine	8
2.2.6. List maline	9
2.2.7. List crnog ribiza	10
2.3. Potencijalna upotreba ekstrakta lista odabranog bobičastog voća	10
2.3.1. Ekstrakt lista borovnice u liječenju dijabetesa.....	11
2.3.2. Fenolni ekstrakti kao biološki konzervansi mesa i mesnih prerađevina.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. List odabranih vrsta bobičastog voća.....	14
3.1.2. Kemikalije i standardi	14
3.1.3. Aparatura i pribor	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Određivanje suhe tvari	17
3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva.....	17
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola.....	18
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	19
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	22
4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	24
4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	26

5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Konzumacija bobičastog voća predstavlja bitan dio ljudske prehrane, u svježem ili prerađenom obliku. Ono je široko rasprostranjeno i uvelike istraženo zbog svih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje zahvaljujući svom bogatstvu bioaktivnim molekulama. Jedna od značajnih skupina takvih spojeva su polifenoli koji dokazano djeluju antioksidativno i protuupalno na organizam te time sprječavaju razvoj određenih zdravstvenih tegoba kao što su dijabetes tipa II, urinarne upale, upale probavnog sustava, a prema nekim istraživanjima i na razvoj određenih vrsta karcinoma. Veliki nedostatak industrijske prerade bobičastog voća je količina biljnog materijala (lišća) koji se odbacuje. Rastom svijesti o zagađenju okoliša te posljedično sve većeg globalnog zatopljenja, traže se načini maksimalnog iskorištenja sirovina i proizvodnje minimalnih količina otpada. Sukladno s time raste broj istraživanja kemijskog sastava lista bobičastog voća i njegove potencijalne iskoristivosti u raznim industrijama, jer je utvrđeno da često list, u usporedbi s plodom, sadrži veći udio bioaktivnih spojeva poput polifenola. To ga čini pogodnim sirovinom za prehrambenu i farmaceutsku industriju gdje se navedeni spojevi mogu ekstrahirati i primijeniti u proizvodnji prehrambenih proizvoda, raznih lijekova ili dodataka prehrani. Tako se list može iskoristiti i smanjiti proizvodnja otpada.

Cilj ovog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola u listu odabranih vrsta bobičastog voća te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata listova FRAP i DPPH metodom.

2. TEORIJSKI DIO

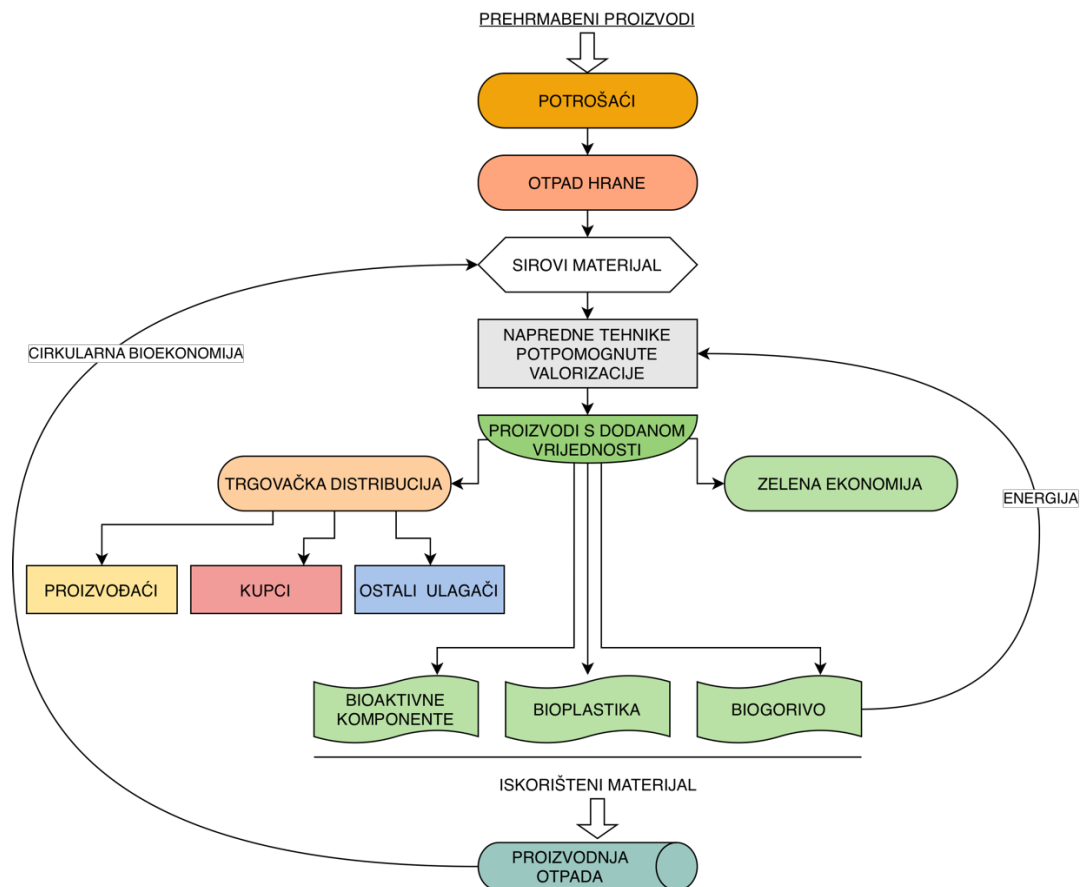
2.1. Otpad bobičastog voća

Bobičasto voće je velika skupina takozvane super hrane i njegova je konzumacija široko rasprostranjena. Nutritivno je bogato, često niskog udjela šećera i jednostavno za kombiniranje s drugim namirnicama ili za konzumaciju kao zaseban obrok. Prema mnogim istraživanjima otkriveni su veliki zdravstveni benefiti konzumacije bobičastog voća za organizam (Ferlemi i Lamari, 2016). U prehrambenoj industriji je često korišteno u raznim oblicima za proizvodnju deserata, sokova, napitaka te smrznutih proizvoda.

Prilikom uzgoja, branja i industrijske obrade bobičastog voća, list se najčešće ne iskoristi već se odbacuje kao otpad. Međutim, sve su češća istraživanja njihovog sastava i traže se načini potencijalne upotrebe kako bi se količina otpada maksimalno smanjila. Uvidom u tradicionalnu upotrebu lista raznih vrsta bobičastog voća, može se zaključiti da ima veliku biološku vrijednost i može se iskoristiti kao alternativni izvor biokomponenti (Luo i sur., 2019; Ponder i Hallman, 2019; Ferlemi i Lamari, 2016). Usporednom analizom sastava pojedinih biološki važnih kemijskih spojeva kao što su polifenoli u bobici i listu, dokazano je da list sadrži znatno više količine tih spojeva nego same bobice (Teleszko i Wojdylo, 2015).

U današnje vrijeme priča o otpadu od globalne je važnosti. Prenapučenost Zemlje i neprestani rast populacije zahtjeva i veću proizvodnju hrane i lijekova kao osnovnih ljudskih potreba. Nažalost, to dovodi i do veće proizvodnje otpada, ne samo u industriji već i otpada koji proizvodi svaki pojedinac. Hrana se u velikim količinama ne iskoristi i odbacuje kad više nije ispravna za konzumaciju. Prehrambeni otpad sadrži visoke koncentracije hranjivih tvari kao što su proteini, ugljikohidrati i masti koji predstavljaju savršenu hranjivu podlogu za razvoj patogenih mikroorganizama i nametnika. Truljenjem se oslobađaju staklenički plinovi u atmosferu koji pospješuju globalno zatopljenje, a dolazi i do kontaminacije zemlje i voda. Negativnim utjecajem na okoliš, ova događanja indirektno utječu i na zdravlje ljudi (Sharma i sur., 2021).

Porastom svijesti o očuvanju okoliša i željom za sprječavanjem daljnjeg globalnog zatopljenja, cirkularna bioekonomija dobiva na važnosti kao i „zero-waste“ politika. Glavni principi uključuju održivost i razvoj novih tehnologija koje će rezultirati biološki prihvatljivijim proizvodima kako bi se smanjilo negativno djelovanje na okoliš i iscrpljivanje prirodnih resursa (Sharma i sur., 2021). Na Slika 1 nalazi se pojednostavljeni prikaz djelovanja cirkularne bioekonomije.



Slika 1. Shematski prikaz cirkularne bioekonomije na primjeru prehrambenog otpada (prema Sharma i sur., 2021)

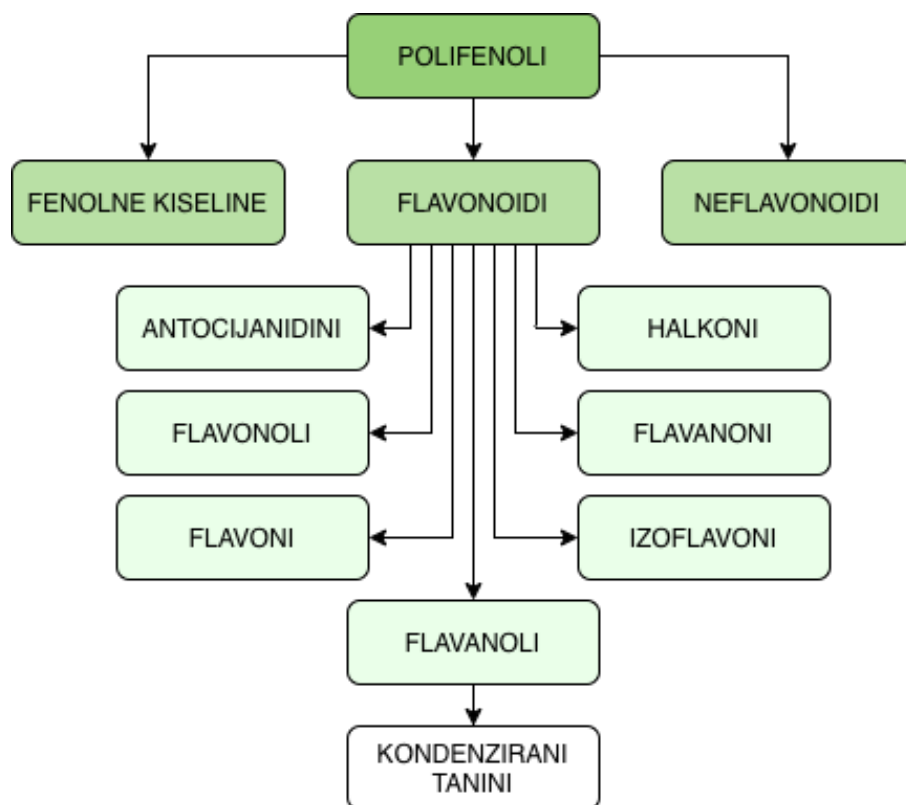
Također, u cilju je ponuditi adekvatna rješenja za potencijalnu upotrebu onoga što se smatra otpadom. Jedna od takvih opcija je međusobna suradnja i povezanost različitih industrija koje bi mogle razmijeniti i iskoristiti otpadne materijale za nove proizvode. Reciklaža predstavlja bitnu sastavnicu cirkularne bioekonomije. Organski otpad se može prenamijeniti, na primjer, za stočnu hranu ili proizvodnju biogoriva. Određeni organski otpad kao što su lišće, kora, otpadci obrade voća i povrća bogati bioaktivnim molekulama koje se mogu ekstrahirati, pronalaze potencijalnu primjenu u proizvodnji lijekova, dodataka prehrani i kozmetičkih proizvoda te kao ponovna sirovina u prehrambenoj industriji (Sharma i sur., 2021; Franco-Garcia i sur., 2019).

2.2. Kemijski sastav lista odabranog bobičastog voća

Kao što je opisano, lišće bobičastog voća najčešće ostane neiskorišteno i završi kao industrijski otpad. No promatrajući njegov kemijski sastav i bogatstvo bioaktivnim komponentama jasno je da se može dobro iskoristiti. Kemijski sastav lista ovisi o brojnim okolišnim i biološkim faktorima kao što su klimatski uvjeti, gnojidba, vrsta tla, vlažnost zraka, navodnjavanje, starost biljke, vrijeme berbe te razlike u samim biljnim vrstama. Ovisno o godišnjem dobu, izloženosti suncu i temperaturama, sastav lista je promjenjiv uslijed transformacije kemijskih spojeva iz jednog oblika u drugi (Routray i Orsat, 2014). Jedna od najznačajnijih skupina bioaktivnih spojeva pronađenih u listu bobičastog voća su polifenoli.

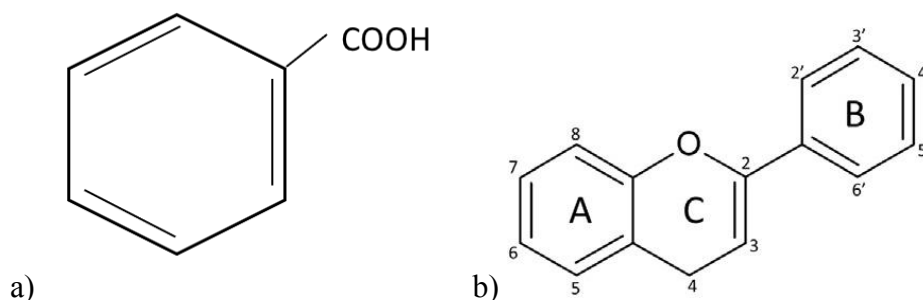
Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se nalaze u skoro svim biljnim dijelovima (korijen, stabljika, list, cvijet, plod, kora i sjemenka) i imaju ulogu u zaštiti biljaka od nametnika, UV zračenja, mikrobnih oboljenja i oksidativnih promjena (Stevenson i Hurst, 2007). Utječu na morfološka i organoleptička svojstva kao što je boja određenih biljnih organa i plodova te okus i gorčinu jestivih dijelova biljke (De la Rosa i sur., 2019; Stevenson i Hurst, 2007). U ljudsku prehranu dopijevaju unosom raznolikog voća i povrća, sjemenki, žitarica i biljnih napitaka. Prema brojnim kliničkim i nutricionističkim istraživanjima dokazani su mnogi pozitivni učinci na zdravlje koji se najviše povezuju s njihovom antioksidativnom aktivnošću i protuupalnim djelovanjem (De la Rosa i sur., 2019; Zhang i Tsao, 2016; Stevenson i Hurst, 2007).

Osnovna kemijska struktura polifenola sastoji se od najmanje jednog benzenskog prstena na koji su direktno vezane dvije ili više fenolnih hidroksilnih skupina. Prema strukturi polifenoli se dijele na tri osnovne grupe: fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide (lignani i stilbeni) (Slika 2) (De la Rosa i sur., 2019; Zhang i Tsao, 2016; Stevenson i Hurst, 2007).



Slika 2. Shematski prikaz podjele polifenola (prema Zhang i Tsao, 2016)

Fenolne kiseline se sastoje od jednog fenolnog prstena (Slika 3a), to su hidroksilirani derivati aromatskih karboksilnih kiselina. Predstavnici ove skupine su hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Zheng i Tsao, 2016.). Osnovnu strukturu flavonoida čine dva fenolna prstena (prsten A i prsten B) koji su međusobno povezani oksigeniranim heterocikličkim prstenom C (Slika 3b) (De la Rosa i sur., 2019; Zhang i Tsao, 2016). U prirodi ih često pronalazimo u obliku glikozida. Dijelev se na 7 podskupina kako je prikazano na Slika 2.



Slika 3. Prikaz osnovnih struktura a) fenolnih kiselina i b) flavonoida (prema De la Rosa i sur., 2019)

2.2.1. List borovnice

Borovnica je niska višegodišnja grmolika biljka iz roda *Vaccinium*. Ima male jajolike listove duljine 2-3 cm, sitnopilastih rubova i zelene boje s obje strane (Bljajić, 2018). Listovi borovnice upotrebljavaju se u tradicionalnoj medicini za tretiranje brojnih zdravstvenih stanja kao što su dijabetes (Tundis i sur., 2021; Bljajić, 2018), anemija, urinarne infekcije, respiratorne upale, reuma te simptomi prehlade (Tundis i sur., 2021). Provedena su brojna istraživanja kojima je utvrđena antimikrobna, protuupalna i jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata lista borovnice zahvaljujući njegovom kemijskom sastavu (Wu i sur., 2019; Deng i sur., 2014).

Listovi borovnice pokazali su bogat polifenolni sastav. U značajnim količinama pronađeni su fenolni spojevi koji pripadaju skupinama proantocijanidina, flavonoida (flavonoli, flavanoli) i fenolnih kiselina. Određene vrste iz roda *Vaccinium* s crvenim listovima u svom sastavu sadrže i antocijane kojih nema u zelenim listovima (Tundis i sur., 2021). Stefănescu i sur. (2020) su analizom listova šest vrsta borovnice u Rumunjskoj definirali 19 različitih fenolnih spojeva. Identificirane su 4 različite hidroksicimetne kiseline, 6 različitih flavonola, 6 flavanola te 3 vrste antocijana. U svim uzorcima najveći udio pronađenih polifenola činile su hidroksicimetne kiseline, od kojih feruloil kininska kiselina u najvećoj količini ($19.23 \pm 0.18 - 49.62 \pm 0.41$ mg/g ovisno o sorti). U skupini flavonola, najveći je udio rutina s vrijednostima od 31.53 ± 0.1 do 35.77 ± 0.19 mg/g. Od flavanola identificirani su procijanidin dimer II i procijanidin trimer u svim analiziranim uzorcima, dok su u značajno manjoj količini i manjem broju uzoraka pronađeni epikatehin, galokatehin i procijanidin dimer I. Udio antocijana je značajno manji u usporedbi s udjelom dosad navedenih spojeva (< 1 mg/g) te su pronađeni samo kod vrsta s crvenim listom. Slične rezultate analize dobili su Wang i sur. (2015) tijekom provođenja analize uzoraka lista 104 kultivara borovnice.

2.2.2. List brusnice

Brusnica (*Vaccinium* sp.) je niski višegodišnji grm tankih drvenastih stabljika visine do 1 m. Listovi brusnice su tamnozeleni, sjajni i kožasti, s trbušne strane svijetloplavi, vrhova blago uvinutih prema dolje (Česonienė i sur., 2013). U tradicionalnoj medicini listovi brusnice se koriste u obliku čaja te za ublažavanje simptoma i liječenje infekcija urinarnog trakta zbog svojih antibakterijskih svojstava (Mathison i sur., 2014). Također je zabilježena antidijabetička aktivnost listova vrste *V. macrocarpon* L. (Ferlemi i Lamari, 2016).

Oszmianski i sur. (2016) analizirali su kemijski sastav lista *Vaccinium macrocarpon* L. i identificirali polifenolne spojeve. U uzorcima lista pronađene su 24 polifenolne komponente: 5 antocijana, 4 fenolne kiseline, 7 flavan-3-ola, 7 flavonola i dihidrokalkon. Najveći udio pronađenih polifenola činili su flavan-3-oli, u najvećoj količini procijanidin polimeri ($8249.0 \pm 45.0 - 10590.0 \pm 116.0$ mg/100 g s.tv.). Druga najzastupljenija skupina su fenolne kiseline, od kojih klorogenska kiselina u najvećoj količini ($445.4 \pm 4.5 - 794.8 \pm 7.9$ mg/100 g s.tv.). Najznačajniji predstavnik identificiranih flavonola bio je kvercetin-3-*O*-glukozid ($1787.7 \pm 17.8 - 13891.7 \pm 13.8$ mg/100 g s.tv.). U listu je pronađen i značajan udio antocijana među kojima količinski najviše cijanidin-3-*O*-arabinozid ($1039.3 \pm 10.9 - 1396.3 \pm 13.9$ mg/100 g s.tv.). Jedini identificirani dihidrohalkon bio je florizin ($311.8 \pm 3.1 - 572.3 \pm 5.7$ mg/100 g s.tv.).

Teleszko i Wojdylo (2015) analizom polifenolnog sastava lista iste vrste brusnice dobili su malo drugačije rezultate. Najveći udio polifenola u uzorku činili su flavonoli (3364.91 mg/100 g s.tv.), što je značajno više od udjela flavan-3-ola (2276.07 mg/100 g s.tv.) te udjela fenolnih kiselina (236.25 mg/100 g s.tv.).

2.2.3. List crnog dudu

Crni dud (*Morus nigra*) je listopadno stablo. Može narasti do visine od 15 m i ima velike sjajne, svijetlozelene tanke listove (Killedar i Pawar, 2017). List crnog dudu je od velike ekonomske važnosti jer se koristi kao hrana za dudove svilce kod proizvodnje svile (Taufik i sur., 2016). Sadrže visok udio proteina, ugljikohidrata, vitamina, mikroelemenata i dijetalnih vlakana zbog čega su prepoznati kao dobar izvor hrane. Implementiraju se u razne prehrambene proizvode u obliku praha, kao na primjer u proizvodnji sladoleda (Koreja) i kao osnovni sastojak tradicionalnog jela *pratha* (Indija) (Polumackanycz i sur., 2021). Čaj lista crnog dudu pokazao se korisnim kod hiperkolesterolemije, dijabetesa, pretilosti, anemije i visokog tlaka. Posjeduje i hepatoprotektivna, antioksidativna, protuupalna te antidepresivna svojstva (Polumackanycz i sur., 2021; Zeni i sur., 2017).

Polumackanycz i sur. (2021) analizirali su polifenolni sastav hidrometanolnog ekstrakta lista crnog dudu. Pronađeno je 10 spojeva, većinom fenolnih kiselina od kojih u najvećoj mjeri kafeinske (336.17 ± 1.98 µg/g uzorka) i klorogenske kiseline (291.78 ± 4.75 µg/g uzorka). Od ostalih spojeva identificiran su flavonoli rutin (115.21 ± 1.41 µg/g uzorka), mircetin (65.55 ± 2.59 µg/g uzorka) i naringenin (109.61 ± 2.97 µg/g uzorka). Zeni i sur. (2017) su također u

hidrometanolnom ekstraktu lista pronašli kafeinsku, klorogensku i galnu kiselinu te flavonole rutin i kvercetin.

2.2.4. List šumske jagode

Šumska jagoda (*Fragaria vesca* L.) je niska puzeća biljka koja raste prirodno u područjima subtropske klime. Pripada porodici Rosaceae (Ivanov, 2018; Ivanov i sur., 2015). Listovi su mali, jajasti i dlakavi, krupnopilastog ruba s dlakavim peteljka (Anonymous 1). Tradicionalno se koriste za gastrointestinalne tegobe i probleme s kožom (Ivanov, 2018), a imaju antioksidativna, antibakterijska te protuupalna djelovanja (Ivanov, 2018; Ivanov i sur., 2015).

Listovi šumske jagode u svom sastavu sadrže fenolne spojeve kao što su tanini, proantocijanidini, flavonoidi i fenolne kiseline. Ivanov i sur. (2015) utvrdili su udio ukupnih fenola u infuziji i dekoktu lista šumske jagode koje su iznosile 28-37 mg GAE/g s.tv. za infuziju i 39-46 mg GAE/g s.tv. za dekokt. Polifenoli su kvantificirani HPLC-MS i GC-MS metodama. Identificirani su flavonoidi (derivati kvercetina i kampferola), proantocijanidini (procijanidin B1, epigalokatehin i katehin) i elagitanini (sanguin H-6, kastalagin i glikozidi elaginske kiseline). Ivanov (2018) je proveo istu analizu, ali s drugačijim otapalom. Kao rezultat je dobio znatno veći udio ukupnih polifenola u ekstraktima (107.5 ± 1.2 mg GAE/g s.tv. u infuziji i 129.0 ± 1.2 mg GAE/g s.tv. u dekoktu).

2.2.5. List kupine

Kupina je višegodišnji zeleni grm iz roda *Rubus*. Listovi su jednostavni, plojke su tamno zelene boje s gornje, a svijetlo zelene s donje strane. Duž peteljki i žila lista imaju kratke bodlje (Ferlemi i Lamari, 2016). List kupine koristi se kao čaj za tretiranje raznih zdravstvenih tegoba kao što su ateroskleroza, hipertenzija i bolesti zračenja (Pavlović i sur., 2016). Primjenjuje se i kao vodica za ispiranje usta, djeluje na upale zubnog mesa, upale grla i čireve u ustima (Ferlemi i Lamari, 2016). U Njemačkoj, čaj lista kupine službeno je odobren za tretiranje nedefiniranih dijareja (Oszmiański i sur., 2015), ali je bitno primjenjivati manje dnevne doze zbog štetnog utjecaja tanina na zdravlje jetre. Istraživan je i antibakterijski utjecaj fenolnog ekstrakta lista kupine na *Helicobacter pylori*, bakterije koja izaziva gastrointestinalne upale (Oszmiański i

sur., 2015).

U radu Oszmiański i sur. (2015) provedena je analiza polifenolnog sastava lista 26 vrsta kupine. Izolirana su 33 polifenolna spoja. Najveća određena skupina su elagitanini u količinama 51.59 – 251.01 mg/g s.tv. Drugi značajni identificirani spojevi su derivati kvercetina, kampferola, luteolina i apigenina (35.17 mg/g s.tv.). Također pronađene su fenolne kiseline (derivati kafeinske, *p*-kumarinske i elaginske kiseline) u količinama 28.74 mg/g s.tv.

2.2.6. List maline

Malina (*Rubus idaeus* L.) grmolika je listopadna višegodišnja biljka visine do 2 m. Stabljike su drvenaste i prekrivene sitnim bodljama. Listovi maline su tamnozeleno boje i glatkog lica, a dlakavog naličja, šiljasti i pilasto nazubljeni (Anonymous 2). Čaj lista maline popularan je među ženama jer balansira hormone i olakšava menstrualne grčeve (Ferlemi i Lamari, 2016), a posebno među trudnicama zbog vjerovanja da stimulira trudove i potiče otvaranje i porod te skraćuje njegovo trajanje. Međutim, nije dokazana povezanost konzumacije čaja lista maline s događajima vezanima uz porod i njegov tijek (Luo i sur., 2019; Ferlemi i Lamari, 2016). Ono za što se pokazao djelotvoran su slabije upale grla, slabije dijareje (Ferlemi i Lamari, 2016), prehlada, dijabetes te kolike (Luo i sur., 2019). Zabilježeno je citoprotektivno djelovanje kod karcinoma grkljana i adenokarcinoma debelog crijeva (Luo i sur., 2019).

Ponder i Hallman (2019) analizom lista 5 vrsta maline utvrdili su njegov polifenolni sastav. Pronađene su fenolne kiseline (52.94 ± 6.42 - 64.09 ± 3.80 g/100 g svježeg lista) i flavonoidi (67.01 ± 7.47 - 72.01 ± 3.77 g/100 g svježeg lista). Najveći udio svih spojeva činio je flavonoid kvercetin-3-*O*-glukozid (21.49 ± 3.55 - 31.31 ± 4.13 g/100 g svježeg lista). Od fenolnih kiselina najveći udio imale se elaginska kiselina (15.18 ± 2.41 - 16.69 ± 2.46 g/100 g svježeg lista) i *p*-kumarinska kiselina (14.77 ± 0.83 - 25.02 ± 3.89 g/100 g svježeg lista). Ferlemi i Lamari (2016) zabilježili su slične rezultate. Flavonoidi su bili najzastupljeniji dok je udio fenolnih kiselina bio manji. U najvećoj količini bile su klorogenska i kafeinska kiselina, dok je elaginska kiselina detektirana u jako malim količinama.

2.2.7. List crnog ribiza

Crni ribiz (*Ribes nigrum* L.) trajni je listopadni grm visine do 2 m. Pripada obitelji Grossulariaceae (ogrozdovke). Ima jednostavne dlanoliko krpaste listove podijeljene u 3-5 režnjeva s dugim peteljka i srcolike baze. Plojke su glatke s gornje strane, a dlakave s donje, skoro pa zaobljene i nepravilno nazubljenih rubova (Orban i sur., 2021). Kao kod ostalih vrsta bobičastog voća, list crnog ribiza ima antioksidativni i protuupalni učinak (Cyboran i sur., 2014; Raudesepp i sur., 2010). Čaj lista crnog ribiza tradicionalno se koristi kao prirodni diuretik te kao dijaforetik (potiče znojenje) (Raudsepp i sur., 2010). Također ima probiotička svojstva te ubrzava metabolizam (Cyboran i sur., 2014).

Analizom polifenolnog sastava lista crnog ribiza pronađene su fenolne kiseline i flavonoidi (Nowak i sur., 2016; Raudsepp i sur., 2010). Nowak i sur. (2016) identificirali su pet fenolnih kiselina (galnu, klorogensku, siringinsku, derivate kafeinske i neoklorogensku) te pet flavonoida (epigalokatehin, kvercetin glikozid, kampferol galaktozid, kampferol rutinozid i kampferol glukozid). Dominantni spojevi u fenolnom ekstraktu bili su galna kiselina i derivati kvercetina. Raudsepp i sur. (2010) svojom analizom pronašli su epigalokatehin, klorogensku kiselinu, nekoliko derivata kvercetina, kampferola i mircetina te nekoliko nedefiniranih spojeva. U najvećoj količini bili su klorogenska kiselina (1493 mg/100 g suhog lista) te kvercetin glukozid (1947 mg/100 g suhog lista).

2.3. Potencijalna upotreba ekstrakta lista odabranog bobičastog voća

Porastom svijesti o važnosti nutritivno bogatih namirnica koje imaju pozitivan učinak na postojeća zdravstvena stanja kao i sprječavanje nastanka istih, pojmovi super hrane, funkcionalne hrane, dodataka prehrani i nutraceutika postaju sve popularniji. Istraživanja i sama potraga za ovakvim namirnicama zadnjih godina pridonijela je značajnom razvoju industrija kao što su prehrambena i farmaceutska industrija. Bobičasto voće u upotrebi je odavno i utjecaj njegove konzumacije na zdravlje organizma uvelike je istražen, dok su istraživanja potencijalne iskoristivosti lišća, koje je najčešće otpad u preradi bobičastog voća, u sve većem porastu (Ferlemi i Lamari, 2016).

2.3.1. Ekstrakt lista borovnice u liječenju dijabetesa

Upotreba biljnih pripravaka za liječenje ili ublažavanja simptoma dijabetesa seže u daleku povijest. U prirodi se nalazi više od 400 biljnih vrsta s hipoglikemijskim odnosno antidijabetičkim djelovanjem, a primjena tih biljnih ekstrakata danas može biti nešto drugačija od tradicionalne. Prema WHO-u (eng. *World Health Organization*) procijenjeno je da se veliki dio populacije, pogotovo zemalja s brzim razvojem, još uvijek koristi biljnim lijekovima i tradicionalnim oblicima liječenja. Razlozi su različiti, prevladava nezadovoljstvo pruženom zdravstvenom skrbi, a dostupnost i pristupačnost lijekova je često ograničena zbog čega ljudi teže samoliječenju ljekovitim biljem. U današnjim farmakološkim istraživanjima fokus se stavlja na identifikaciju, izolaciju i proučavanje mehanizama djelovanja pojedinih kemijskih spojeva izoliranih iz biljnih materijala kao i njihova primjena u razvoju i poboljšanju komercijalnih lijekova za dijabetes (Bljajić, 2018).

U radu Bljajić (2018) ispitivani su biološki učinci biljnih antidijabetika hrvatske etnomedicine. Proučavani su različiti mehanizmi djelovanja vodenih i etanolnih ekstrakata različitih dijelova biljnog materijala među kojima i lista borovnice (*V. myrtillus* L.). Analiziran je fenolni sastav ekstrakata i identificirani pojedini fenolni spojevi.

Antiradikalna aktivnost i antioksidativna obrana organizma pokazala se izuzetno važnom za razvoj dijabetesa 2 i vezanih komplikacija. Ispitivana je antiradikalna aktivnost gdje su oba ekstrakta borovnice pokazala najbolje rezultate od svih analiziranih materijala, a ključni fenolni spojevi za ovo djelovanje pronađeni u borovnici su hidroksicimetne kiseline i flavonoidi.

Postprandijalna hiperglikemija je višak šećera u krvi nakon uobičajenog unosa hrane (> 10 mmol/L). Važno ju je kontrolirati, a jedan od enzima koji sudjeluju u njezinoj kontroli je α -glukozidaza. Djelovanjem tog enzima dolazi do cijepanja oligosaharida na monosaharide u tankom crijevu i olakšava se apsorpcija glukoze. Kada je enzim inhibiran, smanjuje se brzina reakcije i samim time usporava brzina apsorpcije glukoze u krv. Na aktivnost tog enzima utjecaj imaju polifenolni spojevi. Svi uzorci korišteni u istraživanju pokazali su inhibitorni učinak na α -glukozidazu, a najbolji rezultati dobiveni su s etanolnim ekstraktom lista borovnice. Prema istraživanjima kombinacija polifenola u ekstraktu lista borovnice, s naglaskom na klorogensku kiselinu, ima jako inhibitorno djelovanje na enzim α -glukozidazu.

2.3.2. Fenolni ekstrakti kao biološki konzervansi mesa i mesnih preradevina

Prema Pravilniku o prehrambenim aditivima (NN 81/2008) konzervansi su definirani kao: „tvari koje produžuju rok trajanja hrane, koji dodani hrani, uz odgovarajuće uvjete sprečavaju ili usporavaju razmnožavanje mikroorganizama u hrani ne utječući bitno na senzorska svojstva“. Konzervansi kao takvi služe za očuvanje kvalitete i trajnosti proizvoda koju mikrobnе aktivnosti mogu narušiti (negativne organoleptičke promjene i gubitak zdravstvene ispravnosti proizvoda), a možemo ih podijeliti na kemijske i biološke konzervanse.

Industrija prerade mesa zahtjeva primjenu kemijskih konzervansa zbog svojstava mesa (visok aktivitet vode i visok udio hranjivih tvari) koje ga čine idealnom podlogom za mikrobni razvoj. Kemijski konzervansi koji se koriste su najčešće razni nitrati koji se kombiniraju sa soli i zamjenama za sol. Djeluju tako što inhibiraju rast i razvoj patogenih mikroorganizama, smanjuju oksidaciju mesa te pozitivno utječu na organoleptička svojstva kao što je boja mesa. Ova skupina konzervansa može imati štetan utjecaj na ljudsko zdravlje jer tijekom termičke obrade dolazi do formiranja kancerogenih spojeva kao što su N-nitroamini. Kako bi se smanjila uporaba kemijskih konzervansa, istraživanja se fokusiraju na antimikrobne i antioksidacijske spojeve izolirane iz biljnih materijala, među kojima i polifenole (Efenberger-Szmechtyk i sur., 2020; Nowak i sur., 2016).

Prema provedenim istraživanjima nije moguće odrediti točan mehanizam djelovanja polifenola na bakterije. Ono što je potvrđeno je da značajno bolji učinak imaju kombinirani polifenolni ekstrakti od zasebnih spojeva te da uspješno djeluju na mikrobnо kvarenje uzrokovano patogenim bakterijama, kvascima i plijesnima. Način na koji djeluju na neki mikroorganizam ovisi o vrsti mikroorganizma, njihovoj staničnoj strukturi, posebice strukturi vanjske stanične membrane, kao i brojnosti i poziciji fenolnih grupa u spoju te koncentraciji polifenola u ekstraktu. Polifenoli mogu razgraditi i uništiti membranu bakterijske stanice i time izazvati izlaženje staničnog sadržaja što dovodi do smrti stanice. Također, mogu utjecati na biosintetske reakcije kod bakterija čime mijenjaju njihove metaboličke procese i izazivaju smrt stanice. Kod stvaranja biofilmova, polifenolni spojevi mogu imati protagonističko i antagonističko djelovanje. Niže koncentracije polifenola u ekstraktu stimuliraju stvaranje bakterijskih biofilmova, dok ga pri višim koncentracijama inhibiraju (Efenberger-Szmechtyk i sur., 2020). U radu Nowak i sur. (2016) proučavano je djelovanje ekstrakta lista crnog dudu u proizvodnji svinjskih kobasica tijekom skladištenja u trajanju od 28 dana i uspoređeno s djelovanjem nitrata i ekstrakta lista višnje na isti proizvod. Kao kontrolni uzorak korištene su kobasice tretirane solju. Rezultati su pokazali značajno veći antioksidativni učinak i reduciranu lipidnu

peroksidaciju kod biljnih ekstrakata nego soli, najbolji rezultati dobiveni su s nitratima. Biljni ekstrakti nisu poboljšali boju mesa kobasica. Utjecaj na mikrobnju stabilnost je bio pozitivan, došlo je do stabilizacije rasta broja mikroorganizama i smanjena je njihova metabolička aktivnost. Kontrolni uzorak pokazao je znatno veći razvoj mikroba i narušenu mikrobiološku ispravnost. Također, korišteni biljni ekstrakti nisu negativno utjecali na senzorska svojstva proizvoda.

Varzaru i sur. (2020) proučavali su utjecaj ekstrakata lista brusnice, maline i borovnice na lipidnu peroksidaciju mesa pilećeg zabatka. Lipidna peroksidacija povezana je s brojem nezasićenih masnih kiselina, pileće meso sadrži veći udio takvih masnih kiselina u usporedbi s drugim vrstama mesa što ga čini podložnijim procesu. Ima negativan utjecaj na duljinu roka trajanja mesa i stvaranje toksičnih spojeva što dovodi do ekonomskih gubitaka uslijed slabe kvalitete proizvoda.

U istraživanju je određivan antioksidativni učinak i udio antioksidativnih komponenti, uključujući fenola i njihovih derivata, u ekstraktima lista navedenih biljnih vrsta kao i njihova sposobnost vezanja i uklanjanja štetnih slobodnih radikala. Obuhvaćeno je uklanjanje superoksida, DPPH radikala, hidrogen peroksida i hidroksilnog radikala. Za određivanje utjecaja na lipidnu peroksidaciju uspoređivani su uzorci pilećeg mesa tretirani ekstraktima lista brusnice, borovnice i maline te etilendiamintertraoctenom kiselinom (EDTA) kao sintetičkim antioksidansom. Meso je prethodno tretirano mješavinom željeza i askorbinske kiseline kako bi se potaknula oksidacija lipida. Rezultati su pokazali dobar učinak svih korištenih ekstrakata na sprječavanje lipidne peroksidacije mesa. Od biljnih ekstrakata, najbolji učinak je postignut s ekstraktom lista borovnice, zatim brusnice pa maline, dok je generalno najbolji rezultat dobiven kod uzorka tretiranog sa EDTA.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu određivan je bioaktivni potencijal lista odabranih vrsta bobičastog voća. U uzorcima lista borovnice, brusnice, crnog duda, šumske jagode, kupine, maline i crnog ribiza određen je udio ukupnih fenola te antioksidacijski potencijal pomoću FRAP i DPPH metoda.

3.1. Materijali

3.1.1. List odabranih vrsta bobičastog voća

Za eksperimentalni dio korišteni su komercijalno dostupni uzorci osušenog lista borovnice (Hrvatska, berba 2021.), brusnice (Bugarska, berba 2021.), crnog duda (Hrvatska, berba 2021.), šumske jagode (Hrvatska, berba 2021.), kupine (Hrvatska, berba 2021.), maline (Albanija, berba 2021.) i crnog ribiza (Poljska, berba 2021.) (Suban d.o.o., Hrvatska). Prema uputama na deklaraciji (Slika 4) uzorci su čuvani na tamnom i suhom mjestu do provedbe eksperimenta, a netom prije analize svi uzorci lista su usitnjeni pomoću električnog mlinca.



Slika 4. Deklaracije uzoraka suhog lista bobičastog voća (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Etanol 30 %-tni

Priprema: S obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

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

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg mL⁻¹

Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)

- Klorovodična kiselina, 40 mM

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

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

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

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

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Gram-Mol)

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

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

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba)
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

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

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- 100 %-tni metanol
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tkvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. 500 mg Troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Ohaus, Parsippany, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (DT 512 H, Bandelin Electronic, Berlin, Njemačka)
- Vortex uređaj (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, Pennsylvania, SAD)
- Vodena kupelj (Waterbath WNB 14, Memmert, Schwabach, Njemačka)
- Analizator suhe tvari (Ohaus MB90, Parsippany, SAD)

- Električni mlinac (Waring WSG30, Sprzet Laboratoryjny i Medyczny Labpartner KBS, Varšava, Poljska)

Pribor:

- Plastične Falcon epruvete (50 mL)
- Staklene epruvete
- Menzure (50 mL)
- Staklene čaše
- Odmjerne tikvice (10, 25 i 100 mL)
- Stakleni lijevci
- Filter-papir
- Metalne žličice
- Plastične ladice
- Aluminijska folija
- Mikropipete Eppendorf (100, 1000 i 5000 μ L)
- Nastavci za mikropipete Eppendorf
- Kivete

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari u uzorku određen je pomoću analizatora vlage. Na dno posudice ravnomjerno se raspoređi usitnjeni uzorak (3 g). Analizator se zatim pokrene te se po kraju postupka očita izmjerena vrijednost.

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista bobičastog voća u plastičnu Falcon epruvetu odvaži se 1 g usitnjenog uzorka i doda 20 mL ekstrakcijskog otapala (30% vodena otopina etanola). Dobivena smjesa se izmiješa na Vortex mješalici. Ekstrakcija se provodi 20 min u ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C. Po završetku ekstrakcije smjesa se profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL i

nadopuni otapalom do oznake. Dobiveni ekstrakti (Slika 5) se koriste za daljnje određivanje udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta.



Slika 5. Ekstrakti fenolnih spojeva (*vlastita fotografija*)

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje udjela ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline). Tijekom reakcije, prilikom oksidacije fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima, dolazi do redukcije fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Intenzitet plavog obojenja izravno je proporcionalan udjelu ukupnih fenola u uzorku, odnosno što je veći intenzitet obojenja to je veći udio hidroksilnih ili oksidirajućih grupa fenolnih tvari u uzorku. Koncentracija ukupnih fenola u uzorku mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014.).

Prije provedbe same reakcije dobiveni ekstrakti se razrijede ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

U reakcijsku smjesu dodaje se 100 μ L ekstrakta, zatim 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL vode. Nakon 3 min dodaje se 1 mL otopine natrijeva karbonata. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortex miješalice i termostatiraju 25 min pri 50 °C. Po završetku reakcije mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Potrebno je pripremiti i slijepu probu u koju

se, umjesto ekstrakta, dodaje 100 μL ekstrakcijskog otapala.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremljena otopina galne kiseline (5 mg/L) razrijedi se destiliranom vodom na više razrjeđenja: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Reakcije se postavi po maloprije opisanom postupku s Folin-Ciocalteu reagensom. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (pri 765 nm), pomoću programa Microsoft Excel nacrtala se baždarni pravac. Na apscisu se nanose koncentracije galne kiseline u mg/L, a na ordinatu vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Prema dobivenoj jednadžbi računaju se koncentracije ukupnih fenola u uzorku [1]:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad (R^2 = 0,9997) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg ekvivalenata galne kiselinje (GAE)/g s.t.v. uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). Tijekom reakcije dolazi do prijenosa elektrona, antioksidansi doniraju elektrone slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Prilikom reakcije dolazi do smanjenja intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan s udjelom antioksidansa u uzorku. Dobiveni rezultati FRAP metodom izražavaju se preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Prije provedbe reakcije, dobiveni ekstrakti razrijedeni su ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Uzorci se zatim promiješaju pomoću Vortex miješalice i termostatiraju 5 min pri 37 $^\circ\text{C}$. Po završetku reakcije mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba se priprema s

ekstrakcijskim otapalom umjesto uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremljenu otopinu Troloxa (2 mM) razrijedi se tako da se dobiju otopine u kojima je koncentracija Troloxa 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol/L}$. Zatim se postavi reakcija kao što je opisano s FRAP reagensom. U slijepu probu se umjesto otopine Troloxa dodaje 80 μL 96 %-tnog etanola. Izmjeri se apsorbancija pri 593 nm, a pomoću dobivenih vrijednosti u programu Microsoft Excel nacрта baždarni pravac. Na apscisu se nanose koncentracije Troloxa u $\mu\text{mol/L}$, a na ordinatu vrijednosti apsorbancije pri 593 nm. Prema dobivenoj jednadžbi računaju se antioksidacijski kapacitet [2]:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad (R^2 = 0,9995) \quad [2]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u μmol ekvivalenata Troloxa (TE)/g s.tv. uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

DPPH metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani pomoću stabilnog DPPH radikala. Ovaj radikal je ljubičaste boje i zbog svog nesparenog elektrona ima apsorpcijski maksimum pri 517 nm. Radi se o kolornoj reakciji u kojoj je promjena boje iz ljubičaste u žutu posljedica sparivanja elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa pri čemu nastaje reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Prije provedbe reakcije, dobiveni ekstrakti bobičastog voća razrijeđeni su ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

Za pripremu reakcijske smjese, u staklenu epruvetu se otpipetira 0,7 mL ekstrakta i 1,5 mL pripremljenog DPPH reagensa. Slijepa proba se priprema s 2,25 mL 100 %-tnog metanola.

Reakcija se provodi u mraku 20 min pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremi se 1 mM otopina Troloxa i razrijedi u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μM . Reakcija se postavi na prethodno opisan način s DPPH reagensom. Kao slijepa proba koristi se 2,25 mL 100% metanola. Izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 517 nm koriste se za izradu baždarnog grafa pomoću programa Microsoft Excel. Na apscisi označene su koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol/L}$), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 517 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [3]:

$$Y = -0,008 X + 1,3476 \quad (R^2 = 0,9948) \quad [3]$$

gdje je:

Y = apsorbanacija uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

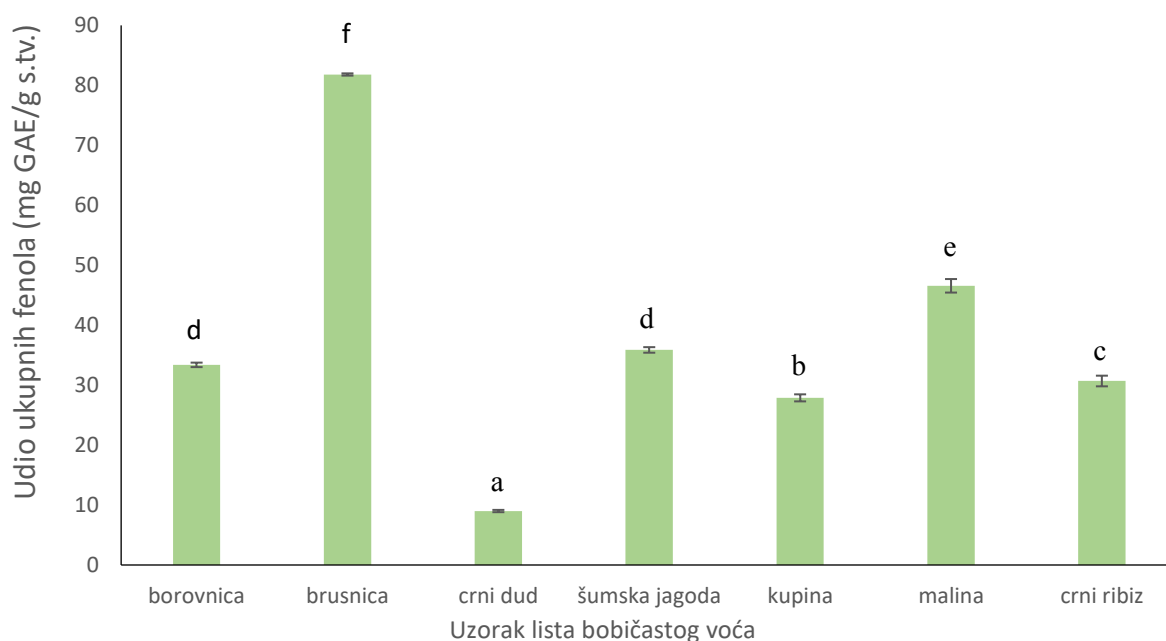
Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. Obrada podataka

Za utvrđivanje signifikantnih razlika između uzoraka korištena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *one-way ANOVA*). Nezavisna varijabla bila je vrsta bobičastog voća (borovnica, brusnica, crni dud, šumska jagoda, kupina, malina i crni ribiz), a zavisne varijable bile su: udio ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.), antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom ($\mu\text{mol TE/g s.tv.}$) i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom ($\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje udjela ukupnih fenola

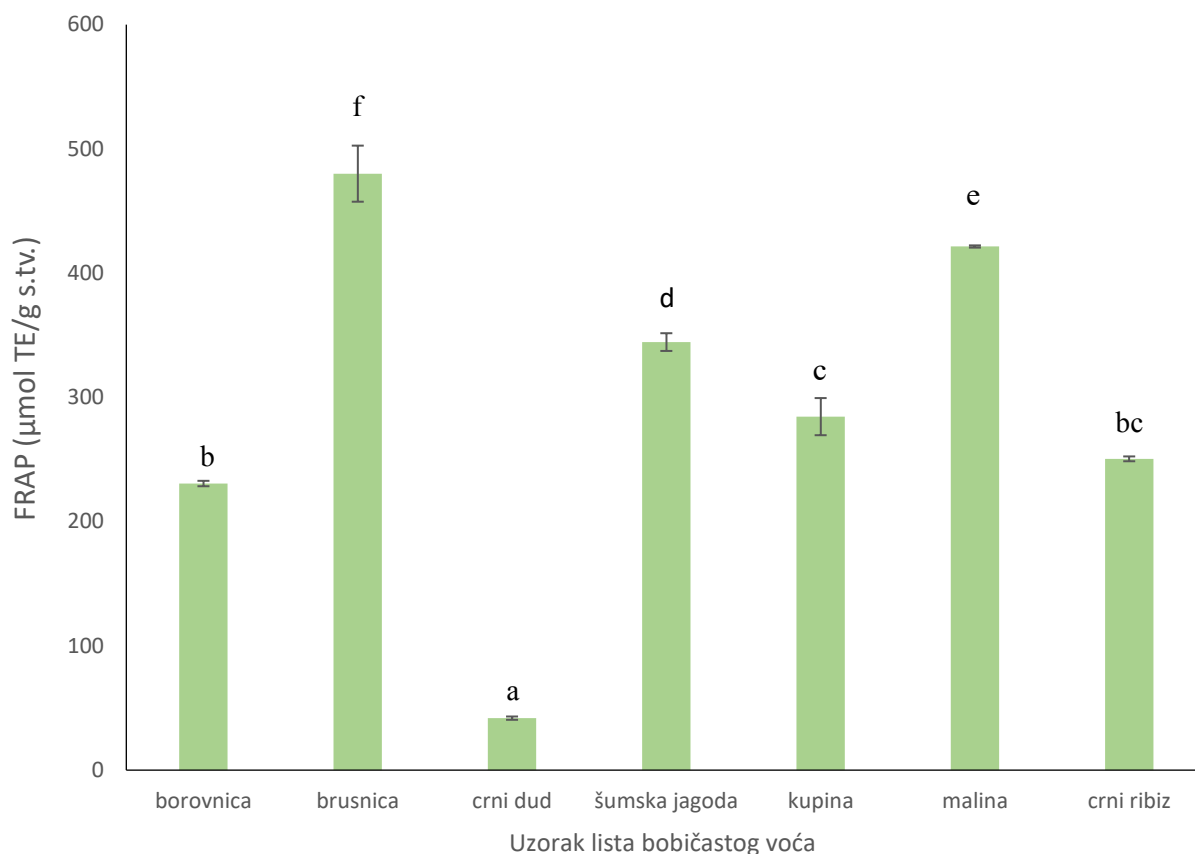


Slika 6. Udio ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) u uzorcima lista bobičastog voća

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola u ekstraktima lista bobičastog voća prikazani su na Slika 6. Dobivene vrijednosti određene su u rasponu od 9,00 do 81,81 mg GAE/g s.tv., pri čemu je najniža vrijednost određena u uzorku lista crnog duda, a najviša u uzorku lista brusnice. Usporedbom rezultata dobivenih u ovom radu s rezultatima dosad provedenih istraživanja, primjećuje se sličan trend kretanja vrijednosti udjela ukupnih fenola među različitim vrstama bobičastog voća. Stefanescu i sur. (2020) kod analize lista borovnice dobili su udio ukupnih fenola od 13555 mg GAE/100 g uzorka lista. Wu i sur. (2019) kao rezultat analize lista 73 kultivara borovnice dobili su udio ukupnih fenola od 47,16 do 224,1 mg GAE/g s.tv. ovisno o vrsti borovnice, što je približno rezultatima dobivenima u ovom radu (33,38 mg GAE/g s.tv.). Routray i Orsat (2014) usporedbom udjela ukupnih fenola u uzorcima lista nekoliko vrsta borovnice tijekom različitih mjeseci berbe dobili su vrijednosti od 86,457 do 155,830 mg GAE/g s.tv. Udio ukupnih fenola određen u listu brusnice u radu Teleszko i Wojdylo (2015) iznosi 11095,46 mg/100 g s.tv., dok su Oszmianski i sur. (2016) kao rezultat dobili vrijednosti u rasponu od 23493,4 do 4000,0 mg/100 g s.tv. Sanchez-Salcedo i sur. (2015) kod analize

udjela ukupnih fenola u listu crnog duda dobili su vrijednosti od 13,48 do 16,13 mg GAE/g s.tv., znatno više vrijednosti od 51,01 do 75,86 mg GAE/g s.tv. odredili su Zeni i sur. (2017) u različitim ekstraktima lista crnog duda, dok su Polumackanycz i sur. (2021) također u različitim ekstraktima lista crnog duda dobili niže vrijednosti u rasponu od 0,17 do 5,19 mg GAE/g s.tv. Kod šumske jagode, udio ukupnih fenola iznosio je od 28,2 do 46,1 mg GAE/g s.tv. u vodenim ekstraktima (Ivanov i sur., 2015). Ivanov (2018) je ponovnom analizom ekstrakta lista šumske jagode s promijenjenim ekstrakcijskim otapalom odredio znatno viši udio ukupnih fenola od 107,5 do 129,0 mg GAE/g s.tv. U ovom istraživanju dobiveno je 35,87 mg GAE/g s.tv. što je u skladu s rezultatima Ivanov i sur. (2015), a uvelike odstupa od rezultata koje je dobio Ivanov (2018). U listu kupine dobiveni udio ukupnih fenola iznosio je 27,88 mg GAE/g s.tv. Znatno više vrijednosti zabilježili su Oszmianski i sur. (2015) (od 83,02 do 334,24 mg/g s.tv.) te Pavlović i sur. (2016) (132,90 mg GAE/g s.tv.). U listu maline određen je udio ukupnih fenola od 46,56 mg GAE/g s.tv. U dosadašnjim istraživanjima dobiveni su rezultati s velikim odstupanjima, gdje su Pavlović i sur. (2016) odredili udio od 84,64 do 144,20 mg GAE/g s.tv, dok su Luo i sur. (2020) dobili maksimalni iznos od 5,56 mg GAE/g s.tv. Udio ukupnih fenola u ekstraktu lista crnog ribiza u provedenim istraživanjima iznosio je 10 mg GAE/g s.tv (Cyboran i sur., 2014) i 2,17 mg GAE/g s.tv. (Nowak i sur., 2016), što je niže od vrijednosti koja je izmjerena u ovom radu (30,69 mg GAE/g s.tv.). Navedena odstupanja moguća su zbog analize različitih sorti pojedinog voća, različitog vremena berbe i agroklimatskih uvjeta uzgoja te primjene različitih metoda ekstrakcije fenolnih spojeva iz uzoraka.

4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

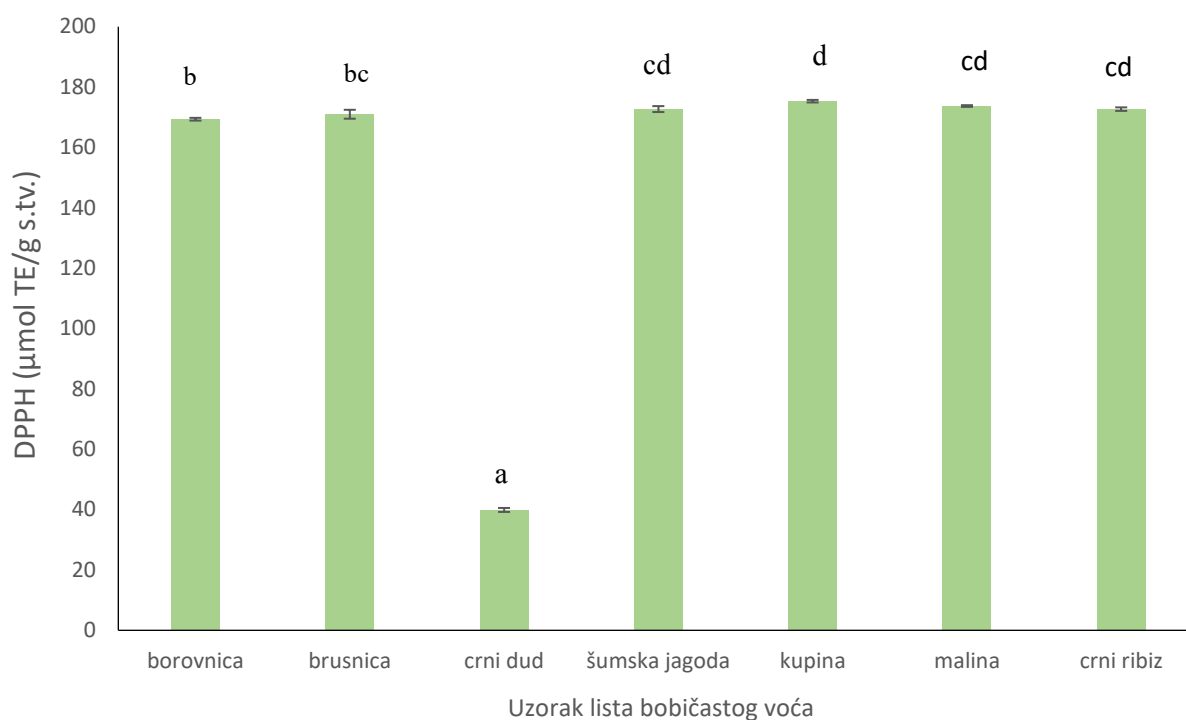


Slika 7. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/g s.tv.}$) u uzorcima lista bobičastog voća određen FRAP metodom

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima lista bobičastog voća određen FRAP metodom prikazane su na Slika 7. Raspon izmjerenih vrijednosti određen je od 41,85 do 480,05 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ Najniža vrijednost određena je u uzorku lista crnog duda, dok je najviša određena u uzorku lista brusnice. Ovakvi rezultati bili su očekivani prema određenom udjelu ukupnih fenola u uzorcima lista (Slika 6). List kupine i crnog ribiza pokazali su nešto viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na list borovnice, iako je u listu borovnice određen viši udio ukupnih fenola. Takve vrijednosti su moguće zbog razlika u sastavu fenolnog ekstrakta lista pojedinog voća gdje različite polifenolne skupine pokazuju jači ili slabiji antioksidacijski učinak. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom u dostupnoj literaturi od kojih se djelomično razlikuju, a eventualna odstupanja moguća su zbog analize različitih sorti voća, različite pripreme uzorka lista te primjene različitih ekstrakcijskih metoda i otapala. Antioksidacijski kapacitet određen u listu

borovnice iznosi 230,67 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ što je u skladu s rezultatima dobivenima u radu Routray i Orsat (2014), gdje je utvrđen antioksidacijski kapacitet lista dvije sorte borovnice ubranog u različitim mjesecima tijekom godine. Rezultati njihove analize kretali su se u rasponu od 142,026 do 267,452 mg ekvivalenata askorbinske kiseline (AA)/g s.tv. Dobivene vrijednosti podudaraju se i s određenim antioksidacijskim kapacitetom u radu Wang i sur. (2015) koji su dobili maksimalnu vrijednost od 139,0 mg GAE/g s.tv. analizom lista 28 kultivara borovnice. List brusnice pokazao je najveći antioksidacijski kapacitet (480,05 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). U provedenim istraživanjima dobivene su vrijednosti u širokim rasponima, Teleszko i Wojdylo (2015) u listu 11 sorti brusnice odredili su antioksidacijski kapacitet od 16,28 do 63,03 mmol TE/100 g s.tv., dok su Oszmianski i sur. (2016) dobili znatno više vrijednosti (137,7- 144,8 mmol TE/100 g s.tv.) u listu tri sorte brusnice. List crnog duda kao uzorak s najnižim udjelom ukupnih fenola pokazao je i najmanji antioksidacijski kapacitet (41,85 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). U radu Polumackanycz i sur. (2021) određen je antioksidacijski kapacitet s vrijednostima od 1,10 do 10,75 mmol $\text{Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$ U istraživanju Ivanov (2018) određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u različitim oblicima fenolnog ekstrakta lista šumske jagode koje su se kretale u rasponu od 678,2 do 1129,1 mmol TE/g s.tv., što je znatno više od vrijednosti dobivene u ovom radu (344,51 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). Visoke vrijednosti određene su u radu Chamorro i sur. (2019), gdje je antioksidacijski kapacitet iznosio od 1064,8 do 1722,4 $\mu\text{mol TE/g}$ fenolnog ekstrakta. U uzorku lista kupine Oszmianski i sur. (2015) izmjerili su antioksidacijski kapacitet u maksimalnoj vrijednosti od 192,91 mmol TE/ g s.tv., što je znatno više od rezultata dobivenih u ovom radu (284,51 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). Lebedev i sur. (2022) analizom lista 25 genotipova maline tijekom različitih fenofaza razvoja utvrdili su antioksidacijski kapacitet u rasponu od 88,4 do 652,9 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju (421,42 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). Približne vrijednosti odredili su Kotula i sur. (2022) u uzorcima lista više vrsta maline ubranih tijekom 2020. i 2021. godine. Izmjerene vrijednosti iznosile su 418,74-1967,93 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ Antioksidacijski kapacitet određen u listu crnog ribiza iznosi 250,54 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ Slične rezultate dobili su Orban i sur. (2021) u vrijednosti od 132 do 278 mg AA/g s.tv. ovisno o sorti, dok su znatno više vrijednosti određene u listu crnog ribiza ubranog u različitim mjesecima tijekom 2018. i 2019. godine (4669,14 do 7411,46 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$) (Ziobron i sur., 2021).

4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/g s.tv.}$) u uzorcima lista bobičastog voća određen DPPH metodom

Na Slika 8 prikazane su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima lista bobičastog voća određenog DPPH metodom ($\mu\text{mol TE/g s.tv.}$). Izmjerene vrijednosti kreću se u rasponu od 39,88 (uzorak lista crnog duda) do 175,32 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ (uzorak lista kupine). Za razliku od vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta utvrđenog FRAP metodom koji velikim dijelom prati trend kretanja udjela ukupnih fenola u uzorku lista, antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pokazao je određena odstupanja. Uzorak crnog duda sukladno s najnižim udjelom ukupnih fenola pokazuje i najnižu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Antioksidacijski kapacitet određen u uzorku lista kupine ima najvišu vrijednost, iako je udio ukupnih fenola u ovom uzorku druga najniža izmjerena vrijednost poslije uzorka lista crnog duda. Uzorci lista šumske jagode, maline i crnog ribiza ne pokazuju značajne razlike u antioksidacijskom kapacitetu određenom DPPH metodom. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom dobivenima u dosad provedenim istraživanjima. Vrijednost izmjerena u uzorku lista borovnice iznosi 169,34 $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$, što se podudara s rezultatima dobivenima u radu Wu i sur. (2019), gdje je određen

antioksidacijski kapacitet lista 73 kultivara borovnice iznosio od 143,6 do 373,2 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. Deng i sur. (2014) su u različitim oblicima ekstrakta lista borovnice utvrdili vrijednosti od 93,86 do otprilike 500 mg AA/g s.tv. Antioksidacijski kapacitet lista brusnice približne je vrijednosti kao i lista borovnice i iznosi 170,99 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. U dostupnoj literaturi zabilježene su značajno više vrijednosti u rasponu od 44,4 do 46,6 mmol TE/100 g s.tv. (Oszmianski i sur., 2016). Prema dosad provedenim istraživanjima, list crnog duda pokazao je niži antioksidacijski kapacitet od ostalog bobičastog voća, što je slučaj i u ovom radu. Sanchez i sur. (2015) izmjerili su vrijednosti od 10,62 do 12,15 mg TE/g s.tv., dok su Polumackanycz i sur. (2021) odredili niže vrijednosti (od 0,09 do 4,31 mg TE/g s.tv.). U dostupnoj literaturi zabilježene su znatno više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u uzorku lista šumske jagode. U radu Ivanov i sur. (2015) dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od 164,8 do 325,0 mmol TE/g s.tv., a Ivanov (2018) je dobio još više vrijednosti, u rasponu od 974,6 do 1255,2 mmol TE/g s.tv. U radu Buričova i Reblova (2008) određena je antioksidativna aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata lista kupine i maline, gdje su vodeni ekstrakti pokazali veću aktivnost od etanolnih (114,8 mg AA/g s.tv. u vodenom, 30,1 mg AA/g s.tv. u etanolnom ekstraktu lista kupine; 102,7 mg AA/g s.tv. u vodenom, 17,1 mg AA/g s.tv. u etanolnom ekstraktu lista maline). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata lista kupine i maline potvrđene su u radu Buričova i sur. (2011). Također utvrđena je veća aktivnost u uzorku lista kupine od lista maline što je dobiveno i u ovom radu. List crnog ribiza prema dosadašnjim istraživanjima pokazao je najveći antioksidacijski kapacitet među ispitivanim uzorcima (od 4316,47 do 7877,82 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv.) (Ziobron i sur., 2021). Sva odstupanja, kao i u prethodnim metodama, moguća su zbog primjene različitih sorti uzoraka, različitih vremena berbe i agroklimatski uvjeta uzgoja, primjene različitih metoda ekstrakcije te različitog fenolnog sastava ekstrakta.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave, može se zaključiti:

1. Ispitivani uzorci lista bobičastog voća pokazali su se kao dobri antioksidansi i dobar izvor polifenolnih spojeva.
2. Udio ukupnih fenola u uzorcima bobičastog voća određen je u rasponu od 9,00 do 81,81 mg GAE/g s.tv. Najniži udio fenola određen je u listu crnog duda, a najviši u listu brusnice.
3. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom pratio je trend vrijednosti udjela ukupnih fenola u uzorcima lista bobičastog voća. Izmjerene vrijednosti kretale su se u rasponu od 41,85 do 480,05 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv., gdje je najniža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjerena u uzorku lista crnog duda, a najviša u uzorku lista brusnice.
4. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pokazao je određena odstupanja u odnosu na udio ukupnih fenola u uzorcima lista bobičastog voća. Izmjerene su vrijednosti u rasponu od 39,88 do 175,32 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. Najniži antioksidacijski kapacitet određen je u uzorku lista crnog duda, a najviši u uzorku lista kupine. Ostali uzorci nisu pokazali međusobno značajna odstupanja u vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Anonymous 1, Šumska jagoda- *Plantea*. <https://www.plantea.com.hr/sumska-jagoda/> Pristupljeno 5. prosinca 2022.

Anonymous 2, Malina- *Plantea*. <https://www.plantea.com.hr/malina/> Pristupljeno 7. prosinca 2022.

Buričova L, Andjelkovic M, Čermakova A, Reblova Z, Jurček O, Kolehmainen E, i sur. (2011) Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *Czech J. Food Sci.* **29**, 181-189.

Buričova L, Reblova Z (2008) Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech J. Food Sci.* **26**, 132-138.

Bljajić K (2018) Fitokemijski sastav i biološki učinci biljnih antidijabetika hrvatske etnomedicine (doktorski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Chamorro MF, Reiner G, Theoduloz C, Ladio A, Schmeda-Hrischmann G, Gomez-Alonso S, i sur. (2019) Polyphenol composition and (bio)activity of *Berberis* species and wild strawberry from the argentinean Patagonia. *Molecules* **24**. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24183331>

Cyboran S, Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Zylka R, Oszmian'ski J, Kleszczyńska H (2014) Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.037>

Česonienė L, Daubaras R, Paulauskas A, Žukauskienė J, Zych M (2013) Morphological and genetic diversity of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L., Ericaceae) clones in Lithuanian reserves. *Acta Soc Bot Pol* **82(3)**, 211–217. <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.2013.026>

De la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parilla E (2019) Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. 253-271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

Deng Y, Yang G, Yue J, Qian B, Liu Z, Wang D, i sur. (2014) Influences of ripening stages and

extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control* **38**, 184-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023>

Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A, Czyzowska A (2020) Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>

Ferlemi AV, Lamari FN (2016) Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, 17. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>

Franco-Garcia ML, Carpio-Aguilar JC, Bressers H (2019) Towards Zero Waste. *Greening of Industry Networks Studies* **6**. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92931-6_1

Ivanov IG (2018) Determination of biologically active substances with antioxidant potential in different extracts of *Fragaria vesca* L. leaves and flowers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **7(5)**, 2733-2737.

Ivanov I, Petkova N, Denev P, Pavlov A (2015) Poliphenols content and antioxidant activities in infusion and decoction extracts obtained from *Fragaria vesca* L. leaves. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XIX*.

Killedar SG, Pawar A (2017) Preparation of herbal tea from mulberry leaves. *Journal of Medicinal Plants Studies* **5(2)**, 325-328.

Kotula M, Kapusta-Duch J, Smolen S, Doskočil I (2022) Phytochemical composition of the fruits and leaves of raspberries (*Rubus idaeus* L.)—conventional vs. organic and those wild grown. *Appl. Sci.* **12**. <https://doi.org/10.3390/app122211783>

Lebedev VG, Lebedeva TN, Vidyagina EO, Sorokopudov VN, Popova AA, Shestibratov KA (2022) Relationship between phenolic compounds and antioxidant activity in berries and leaves of raspberry genotypes and their genotyping by SSR markers. *Antioxidants* **11**. <https://doi.org/10.3390/antiox11101961>

Luo T, Sirui C, Zhang H, Jia S, Wang J (2019) Phytochemical composition and potential biological activities assessment of raspberry leaf extracts from nine different raspberry species and raspberry leaf tea. *Journal of Berry Research*. <https://doi.org/10.3233/JBR-190474>

Mathison BD, Kimble LL, Kaspar KL, Khoo C, Chew BP (2014) Consumption of cranberry beverage improved endogenous antioxidant status and protected against bacteria adhesion in healthy humans: a randomized controlled trial. *Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.03.006>

Nowak A, Czyzowska A, Efenberger M, Krala L (2016) Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus cerasus* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. *Food Microbiology* **59**, 142-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.004>

Orban C, Albert C, Kis E, Molnos E (2021) Antioxidant capacity of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves and buds. *ACTA UNIV. SAPIENTIAE, ALIMENTARIA* **14**, 117-129. <https://doi.org/10.2478/ausal-2021-0007>

Oszmanski J, Wojdylo A, Lachowicz S, Gorzelany J, Matlok N (2016) Comparison of bioactive potential of cranberry fruit and fruit-based products versus leaves. *Journal of Functional Foods* **22**, 232–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.015>

Polumackanycz M, Wesolowski M, Viapiana A (2021) *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition* **76**, 458–465. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00922-7>

Ponder A, Hallmann E (2019) Phenolics and carotenoid contents in the leaves of different organic and conventional raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars and their *in vitro* activity. *Antioxidants* **8**, 458. <https://doi.org/10.3390/antiox8100458>

Pravilnik (2008) Pravilnik o prehranbenim aditivima. Narodne novine 8, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_07_81_2651.html Pristupljeno 8. prosinca 2022.

Raudsepp P, Kaldmae H, Kikas A, Libek AV, Pussa T (2010) Nutritional quality of berries and bioactive compounds in the leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars evaluated in Estonia. *Journal of Berry Research* **1**, 53–59. <https://doi.org/10.3233/BR-2010-006>

Routray W, Orsat V (2014) Variation of phenolic profile and antioxidant activity of North American highbush blueberry leaves with variation of time of harvest and cultivar. *Industrial Crops and Products* **62**, 147–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.020>

Sharma P, Gaur VK, Sirohi R, Varjani S, Kim SH, Wong JWC (2021) Sustainable processing of food waste for production of bio-based products for circular bioeconomy. *Bioresource Technology* **325**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124684>

Stefanescu BE, Calinoiu LF, Ranga F, Fetea F, Mocan A, Vodnar DC, i sur. (2020) The chemical and biological profiles of leaves from commercial blueberry varieties. *Plants* **9**, 1193. <https://doi.org/10.3390/plants9091193>

Stevenson DE, Hurst RD (2007) Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences* **64(22)**, 2900–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1>

Taufik Y, Widiyantara T, Garnida Y (2016) The effect of drying temperature on the antioxidant activity of black mulberry leaf tea (*Morus nigra*). *Rasayan J.Chem.* **9(4)**, 889-895.

Teleszko M, Wojdylo A (2015) Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods* **14**, 736–746. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>

Tundis R, Tenuta MC, Loizzo MR, Bonesi M, Finetti F, Trabalzini L, i sur. (2021) *Vaccinium* species (Ericaceae): From chemical composition to bio-functional activities. *Appl. Sci.* **11**, 5655. <https://doi.org/10.3390/app11125655>

Varzaru I, Untea AE, Saracila M (2020) *In vitro* antioxidant properties of berry leaves and their inhibitory effect on lipid peroxidation of thigh meat from broiler chickens. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **122**. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900384>

Wang LJ, Wu J, Wang HX, Li SS, Zheng XC, Du H, i sur. (2015) Composition of phenolic compounds and antioxidant activity in the leaves of blueberry cultivars. *Journal of Functional Foods* **16**, 295–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.027>

Wu H, Chai Z, Hutabarat RP, Zeng Q, Niu L, Li D, i sur. (2019) Blueberry leaves from 73 different cultivars in southeastern China as nutraceutical supplements rich in antioxidants. *Food Research International* **122**, 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.015>

Zeni ALB, Moreira TD, Dalmagro AP, Camargo A, Bini LA, Simionatto EL, i sur. (2017) Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract.

Anais da Academia Brasileira de Ciências **89(4)**, 2805-2815. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160660>

Zhang H, Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* **8**, 33–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

Ziobron M, Kopeć A, Skoczylas J, Dziadek K, Zawistowski J (2021) Basic chemical composition and concentration of selected bioactive compounds in leaves of black, red and white currant. *Appl. Sci.* **11**. <https://doi.org/10.3390/app11167638>

Izjava o izvornosti

Ja Nina Lovrinović 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.

N. Lovrinović

Vlastoručni potpis