

# Praćenje udjela fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u hidrolatima i eteričnim uljima odabranog samoniklog bilja

---

**Barić, Doris**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:159:188510>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Doris Barić

**PRAĆENJE UDJELA FENOLNIH  
SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE  
AKTIVNOSTI U HIDROLATIMA I ETERIČNIM  
ULJIMA ODABRANOG SAMONIKLOG  
BILJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maja Dent.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PRAĆENJE UDJELA FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U  
HIDROLATIMA I ETERIČNIM ULJIMA ODABRANOG SAMONIKLOG BILJA

*Doris Barić, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210999*

**Sažetak:** U ovom radu istražen je fenolni sastav hidrolata i antioksidacijska aktivnost hidrolata i eteričnih ulja ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača kroz vremenski period od 90 dana. Nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru i odvajanja eteričnih ulja i hidrolata ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača, uzorci se čuvani u staklenoj ambalaži pri sobnoj temperaturi kroz 90 dana. Nakon određenog broja dana čuvanja (0., 7., 14., 21., 30., 60. i 90. dan) spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima i antioksidacijska aktivnost (FRAP i DPPH metodom) u hidrolatima i eteričnim uljima. Dobiveni rezultati su pokazali pad masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača nakon 21. dana, a kadulje nakon 7. dana te smanjenja antioksidacijske aktivnosti u hidrolatima i eteričnim uljima nakon 7. dana, a bosiljka i kadulje nakon 21. i 30. dana.

**Ključne riječi:** *eterično ulje, hidrolat, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost*

**Rad sadrži:** 61 stranica, 37 slika, 2 tablice, 88 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Maja Dent

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Dent (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (član)\*
4. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (zamjenski član)

**Datum obrane:** 23. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory for analytical chemistry**  
**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology  
**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### MONITORING THE PROPORTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE HYDROLATES AND ESSENTIAL OILS OF SELECTED WILD PLANTS

*Doris Barić*, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210999

**Abstract:** In this paper, the phenolic composition of hydrolates and antioxidant activity of hydrolates and essential oils of rosemary, bay laurel, basil, sage and fennel were investigated over a period of 90 days. After hydrodistillation according to Clevenger and separation of essential oils and hydrolates of rosemary, bay laurel, basil, sage and fennel, the samples are stored in glass containers at room temperature for 90 days. After a certain number of days of storage (0, 7, 14, 21, 30, 60 and 90 days), the mass fractions of total phenolic compounds in the hydrolates and the antioxidant activity (FRAP and DPPH method) in the hydrolates and essential oils were determined spectrophotometrically. The obtained results showed a decrease in the mass fraction of total phenolic compounds in hydrolates of rosemary, bay laurel, basil, sage and fennel after 21 days, and sage after 7 days, and a decrease in antioxidant activity in hydrolates and essential oils after 7 days, and basil and sage after 21 and 30 days.

**Keywords:** *essential oil, hydrolate, total phenols, antioxidant activity*

**Thesis contains:** 61 pages, 37 figures, 2 tables, 88 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

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

#### **Reviewers:**

1. Antonija Trontel, PhD, Associate professor (president)
2. Maja Dent, PhD, Associate professor (mentor)
3. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (member)
4. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September, 23th 2024.

## Sadržaj

<b>1.UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. ETERIČNO ULJE .....	2
2.1.1. Svojstva eteričnih ulja .....	2
2.1.2. Sigurnost uporabe eteričnih ulja .....	3
2.2. HIDROLAT .....	3
2.2.1. Svojstva hidrolata .....	3
2.2.2. Sigurnost uporabe hidrolata .....	3
2.3. ČUVANJE ETERIČNOG ULJA I HIDROLATA.....	4
2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA I HIDROLATA .....	4
2.4.1. Eterično ulje i hidrolat ružmarina.....	4
2.4.1.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata ružmarina .....	5
2.4.2. Eterično ulje i hidrolat lovora .....	6
2.4.2.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata lovora .....	7
2.4.3. Eterično ulje i hidrolat bosiljaka.....	7
2.4.3.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata bosiljka .....	8
2.4.4. Eterično ulje i hidrolat kadulje .....	8
2.4.4.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata kadulje .....	9
2.4.5. Eterično ulje i hidrolat komorača .....	10
2.3.5.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata komorača .....	11
2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....	11
2.5.1. Antioksidansi.....	11
2.5.2. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti.....	12
2.5.2.1. HAT metoda .....	12
2.5.2.1.1. ORAC test.....	12
2.5.2.1.2. TRAP test.....	13
2.5.2.1.3. TOSC test.....	13
2.5.2.2. SET metode .....	13
2.5.2.2.1. FRAP metoda.....	13
2.5.2.2.2. CUPRAC metoda.....	15

2.5.2.3. HAT/SET metode .....	15
2.5.2.3.1. DPPH metoda .....	15
2.6. POSTUPCI IZOLACIJE ETERIČNOG ULJA.....	16
2.6.1. Postupak destilacije.....	16
2.6.2. Ekstrakcija pomoću organskih otapala .....	16
2.6.3. Ekstrakcija mikrovalovima .....	17
2.6.4. Ekstrakcija superkritičnim CO <sub>2</sub> .....	17
2.7. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI .....	17
2.7.1. Eterična ulja kao prirodni konzervansi i primjena u aromatiziranju hrane....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Kemikalije .....	19
3.1.2. Aparatura i pribor .....	20
3.2. METODE RADA.....	21
3.2.1. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru ...	21
3.2.2. Čuvanje eteričnog ulja i hidrolata .....	21
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela ukupnih fenola .....	22
3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline .....	23
3.2.3.4. Postupak određivanja ukupnih fenola .....	24
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	24
3.2.4.1. FRAP metodom .....	24
3.2.4.1.2. Izrada baždarnog dijagrama askorbinske kiseline .....	25
3.2.4.1.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	26
3.2.4.2. DPPH metodom .....	26
3.2.4.2.2. Izrada baždarnog dijagrama askorbinske kiseline .....	27
3.2.4.2.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
4.1. RUŽMARIN .....	30
4.1.1. Hidrolat ružmarina .....	30
4.1.2. Eterično ulje ružmarina .....	31
4.2. LOVOR.....	34
4.2.1. Hidrolat lovora .....	34



4.2.2. Eterično ulje lovora .....	36
4.3. BOSILJAK .....	39
4.3.1. Hidrolat bosiljka .....	39
4.3.2. Eterično ulje bosiljka.....	40
4.4. KADULJA .....	43
4.4.1. Hidrolat kadulje.....	43
4.4.2. Eterično ulje kadulje .....	44
4.5. KOMORAČ .....	47
4.5.1. Hidrolat komorača .....	47
4.5.2. Eterično ulje komorača.....	48
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>53</b>

## 1.UVOD

Posljednjih godina potrošači su razvili sve veći interes za prirodne proizvode kao alternativu umjetnim aditivima ili farmakološki relevantnim sredstvima. Aromatične biljke koriste se još od antike u ljekovite svrhe i kao začinsko bilje, a zbog svojeg kemijskog sastava i visokog udjela biološki aktivnih spojeva pronalaze primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Među njima su veliku popularnost stekla eterična ulja i hidrolati koji se dobivaju iz aromatičnih biljaka zbog svog bogatog kemijskog sastava. Eterična ulja su sekundarni metaboliti koji se iz aromatičnih biljaka dobivaju najčešće vodenom destilacijom, a paralelno kao nusprodukt nastaje hidrolat. Hlapljivi spojevi, među kojima monoterpeni i seskviterpeni su najzastupljeniji u eteričnom ulju i hidrolatu te im osiguravaju karakterističnu aromu i biološku aktivnost poput antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja (Turek i Stintzing, 2013).

Cilj ovoga diplomskog rada bio je određivanje masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima i određivanje antioksidacijske aktivnosti u hidrolatima i eteričnim uljima ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača praćenjem njihovih udjela kroz vremenski period od 90 dana čuvanja u staklenoj ambalaži, dobro zatvorene u mraku pri sobnoj temperaturi. Pravilno čuvanje hidrolata i eteričnih ulja je od iznimne važnosti kako bi kroz vremenski period sačuvali svoje biološki aktivne spojeve i antioksidacijsku aktivnost.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ETERIČNO ULJE

Eterična ulja su mješavine hlapljivih spojeva koji se sintetiziraju sekundarnim metaboličkim putevima kod biljaka, posebice onih aromatičnih. Dobivaju se parnom destilacijom, vodenom destilacijom, destilacijom mikrovalovima, superkričnim plinovima (Sadgrove i Jones, 2015) i drugim metodama iz različitih dijelova biljnog materijala kao što su lišće, pupoljci, plodovi, cvijeće, biljke, grančice, kore, drveta, korijenja te sjemenki. Eterična ulja karakteriziraju dvije ili tri glavne komponente koje su prisutne u prilično visokim koncentracijama (20 – 70 %) u usporedbi s ostalim komponentama koje su prisutne u tragovima. Prema najvećem udjelu pojedine kemijske komponente se određuje kemotip eteričnog ulja. Količina različitih komponenti eteričnih ulja varira među različitim biljnim dijelovima i različitim biljnim vrstama (Proto i sur., 2022). Eterična ulja obično uključuju komponente izvedene iz dvije biosintetske skupine, a to su terpeni (monoterpeni, seskviterpeni i njihovi derivati) i fenilpropanoidi (aromatični prsten s propenskim repom). U alifatske spojeve niske molekulske mase pripadaju alkani, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri i kiseline. Komponente eteričnih ulja kemijski su klasificirane prema četiri uvjeta: primarno biosintetsko podrijetlo, veličina ili broj ugljikovih atoma, matična okosnica ili "kostur" i karakter oksidacije elektronegativnim atomima, tj. drugim atomima većim od ugljika, kao što su kisik, dušik ili sumpor (Sadgrove i sur., 2022).

#### 2.1.1. Svojstva eteričnih ulja

Važna karakteristika eteričnih ulja i njihovih komponenti je hidrofobnost. Eterična ulja su manje gustoće od vode, hlapljiva, tekuća, bistra tekućina, topljiva u lipidima te su rijetko obojena (Proto i sur., 2022). Eterična ulja imaju značajno antiseptičko, antibakterijsko, antivirusno, antioksidativno, antiparazitsko, antifungalno i insekticidno djelovanje pa se smatraju potencijalnim izvorima novih antimikrobnih spojeva, sredstava koja promiču očuvanje hrane i alternativa za liječenje zaraznih bolesti. Zbog svojih ljekovitih svojstava imaju široku primjenu u kozmetičkoj industriji te u prehrambenoj industriji kao konzervansi (Proto i sur., 2022). Zamjena za prirodno dobivena eterična ulja su sintetička ulja, koja su cijenom prihvatljivija, međutim, nedostaju im terapijska svojstva. Sintetička ulja su kemijski dobiveni spojevi, dobivaju se iz nafte i petrokemijskih tvari za oponašanje prirodnih mirisa i specifičnih mirisa. Toksični su, mogu imati štetne učinke na hormone, tjelesne funkcije, dišne putove, osobito kod astmatičara, starijih osoba i djece (Lijewski, 2023).

### 2.1.2. Sigurnost uporabe eteričnih ulja

Eterična ulja su posljednjih desetljeća dobila sve veću pozornost, upotrebljavajući se kao arome, mirisi, lijekovi, u aromaterapiji i dr. Iako se općenito smatraju prirodnim i sigurnim, neka eterična ulja mogu izazvati značajne štetne učinke poput iritacije kože i kontaktnog dermatitisa, neurološke toksičnosti ili endokrinih promjena (De Oliveira i sur., 2020). Potreban je oprez prilikom primjene eteričnih ulja te poznavanje sigurnosnog profila eteričnih ulja kako bi se ispravno iskoristili njihovi različiti biološki učinci.

## 2.2. HIDROLAT

Hidrolat je nusprodukt prilikom postupka izolacije eteričnog ulja, poznat je i pod drugim nazivima kao npr. hidrosol, cvjetna vodica, aromatična voda te biljna voda. Hidrolati su koloidne suspenzije koje se sastoje od kontinuirane i disperzne faze. Kontinuiranu fazu čini pročišćena voda, dok disperznu fazu čine emulzije kapljica eteričnog ulja i komponenti topljivih u vodi, odnosno spojeva koji sadrže kisik. Udio hlapljivih komponenti u hidrolatu je niži od pripadajućeg eteričnog ulja te u hidrolatima uglavnom prevladavaju spojevi koji sadrže kisik. Stoga u hidrolatima su zastupljeniji oksigenirani monoterpeni u odnosu na hidrofobne seskviterpene (Miljanović i sur., 2023). Osim hlapljivih komponenti hidrolati sadrže i nehlapljive spojeve kao što su vitamini, minerali, amonioseline, tanini, flavonoidi, karotenoidi i alkaloidi. Hidrolati su svoju široku primjenu našli u kozmetičkoj industriji gdje se koriste kao sastojci mnogih proizvoda kao na primjer krema ili sami kao tonici. Također se mogu primijeniti u prehrambenoj industriji, za inhibiciju razvoja patoloških mikroorganizama u hrani (Jakubczyk i sur., 2021). Zbog visokog udjela biološki aktivnih spojeva, imaju primjenu osim u prehrambenoj industriji i kozmetičkoj industriji i u farmaceutskoj industriji, aromaterapiji te u sektoru agrošumarstva (Aćimović i sur., 2020).

### 2.2.1. Svojstva hidrolata

Hidrolati su tekućine kojima se pH vrijednost kreće u rasponu od 3 do 7 (Georgiev i sur., 2019). Miris hidrolata blaži je nego miris eteričnog ulja ali nekada može biti čak i sličnog intenziteta ovisno o vrsti biljke iz koje se izdvaja. Za razliku od eteričnih ulja koja su lipofilna, hidrolati su hidrofilne tekućine, stoga izolacija eteričnog ulja i hidrolata nakon destilacije je lakša obzirom da se te dvije tekućine međusobno ne miješaju (Jakubczyk i sur., 2021).

### 2.2.2. Sigurnost uporabe hidrolata

S obzirom da hidrolati sadrže otopljene komponente eteričnog ulja u vodi, po svom mirisu su puno blaži od eteričnih ulja, pa samim time i sigurniji za upotrebu. Rijetko mogu izazvati nuspojave, poput glavobolje ili kontaktnog dermatitisa te se mogu nanijeti izravno na kožu ili

progutati (Jakubczyk i sur., 2021). Hidrolati se tradicionalno u nekim zemljama koriste u razrijeđenom obliku u osvježavajućim pićima (D`Amato i sur., 2018).

### 2.3. ČUVANJE ETERIČNOG ULJA I HIDROLATA

Eterična ulja prije skladištenja potrebno je očistiti od nečistoća metala i vlage. Male količine vlage učinkovito se uklanjaju primjenom bezvodnog natrijevog sulfata ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), uz snažno mućkanje, stajanje ili centrifugiranje. Nakon toga, ulja se pohranjuju u staklene bočice izrađene od tvrdog, tamno obojenog stakla za manje količine, dok se veće količine eteričnih ulja spremaju u metalne bubnjeve. Prije hermetičkog zatvaranja većih spremnika, preporučuje se upuhivanje ugljičnog dioksida ili dušika iznad površine ulja kako bi se spriječila oksidacija. Ulja se čuvaju u dobro zatvorenim posudama kako ne bi došlo do oksidacije, izlivanja ili prodora vode u bočicu, na hladnom mjestu, zaštićena od izravnog utjecaja zraka i svjetla, uz dodatak antioksidansa poput vitamina E, kako bi se minimalizirale promjene u kemijskom sastavu i kvaliteti (Kalodjera i sur., 1998). Eterična ulja ne čuvaju se u plastičnim bočicama, podložna su promjenama tijekom starenja kao što je oksidacija terpenoida koja može dovesti do promjena u mirisu, boji i konzistenciji eteričnog ulja, a vijek trajanja eteričnih ulja je oko 3 godine (Turek i Stintzing, 2011). Hidrolati se čuvaju u zatvorenim tamnim sterilnim staklenim bocama na tamnom mjestu radi zaštite od svjetla i zraka te na sobnoj temperaturi (Jakubczyk i sur, 2021).

### 2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA I HIDROLATA

#### 2.4.1. Eterično ulje i hidrolat ružmarina

Eterično ulje ružmarina se dobiva iz listića biljke ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis*) (slika 1) koje pripada porodici *Lamiaceae*, a kao nusprodukt zaostaje hidrolat (Habtemariam, 2016). Eterično ulje i hidrolat ružmarina sličnog su kemijskog sastava, u najvećoj količini su prisutni hlapljivi kemijski spojevi poput oksigeniranih monoterpena, seskviterpena i njihovih derivata. Udjeli hlapljivih komponenti poput monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika zastupljeni su u većoj količini u eteričnom ulju nego hidrolatu, dok hidrolati sadrže veći postotak oksigeniranih monoterpena i oksigeniranih seskviterpena. Miljanović i sur. (2020) identificirali su 60 komponenti u eteričnom ulju ružmarina koje je bilo najbogatije oksigeniranim monoterpenima kao što su borneol (24 %), kamfor (18 %), linalol (6 %) i 1,8- cineol (9 %). Među glavnim seskviterpenima istaknuli su berbenon (22 %) i t-murolol (6 %). Olmedo i sur. (2015) kao glavne komponente eteričnog ulja ružmarina identificirali su 1,8-cineol (22,2 %),  $\beta$ -mircen (21,5 %) i  $\alpha$ -pinen (11 %), a Sacchetti i sur. (2005) verbenon (21,8 %), kamfor (14,6 %), bornil-acetat (12,3 %) i borneol (10,4 %). Kemijski sastav hidrolata ružmarina se razlikuje od eteričnog ulja. Miljanović i sur. (2023) su odredili veći udio oksigeniranog monoterpena 1,8 -cineola (17 %) u hidrolatu nego u eteričnom ulju. Nadalje, hidrolat ružmarina ima veći udio oksigeniranog seskviterpena berbenona (21 – 42 %) od eteričnog ulja. Fenolni spojevi zastupljeni su u nižim udjelima nego hlapljivi spojevi u eteričnom ulju i hidrolatu ružmarina, dok

je udio fenolnih spojeva znatno viši u eteričnom ulju nego u hidrolatu ružmarina. Zbog svog polarnog karaktera fenolni spojevi prisutni su u vodenim ekstraktima ili ekstraktima dobivenim polarnim otapalima, dok ih u ulju i hidrolatu ima vrlo malo (Tai i sur., 2012). Najzastupljeniji fenolni spojevi u eteričnom ulju i hidrolatu ružmarina su ružmarinska kiselina, karnozna kiselina i karnozol. Moreno i sur. (2006) odredili su primjenom tri različita otapala (acetona, metanola i voda) različite udjele fenolnih kiselina i ukupnih fenola. Maseni udio ukupnih fenola izražen je kao g ekvivalenta galne kiseline (GAE) na 100 grama ekstrakta. Primjenom acetona koncentracija ružmarinske kiseline iznosi 4 g/100 g ekstrakta, karnozinske kiseline 22 g/100 g ekstrakta te karnozola 11 g/100 g ekstrakta, a ukupnih fenola 23 g GAE/100 g ekstrakta. Primjenom metanola: udio ružmarinske kiseline iznosi 6 g/100 g ekstrakta, karnozinske kiseline 31 g/100 g ekstrakta, karnozola 16 g/100 g ekstrakta te ukupnih fenola 14 g GAE/100 g ekstrakta. Primjenom vode, udjeli fenola su značajno niži: udio ružmarinske kiseline iznosi 15 g/100 g ekstrakta, udio karnozinske kiseline i karnozola bio je vrlo nizak (ispod granice čitanja) te udio ukupnih fenola od 4 g GAE/100 g ekstrakta.



**Slika 1.** List ružmarina (Saraš, 2021)

#### *2.4.1.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata ružmarina*

Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja ružmarina pripisuje se njegovom kemijskom sastavu, visokom udjelu hlapljivih komponenti kao što su borneol, kamfor i verbenon. Osim hlapljivih sastojaka, ekstrakti ružmarina sadrže nekoliko antioksidativnih komponenti, koje uglavnom pripadaju fenolnim kiselinama, flavonoidima i diterpenoidima (Arranz i sur., 2015). Prema nekim autorima upravo su oksigenirani monoterpeni, seskviterpenski ugljikovodici, alkoholni eteri te fenolni spojevi odgovorni za antioksidacijsku aktivnost ružmarina, dok drugi tvrde da antioksidativna aktivnost eteričnog ulja ružmarina je povezana sa prisutnošću spojeva, kao što su verbenon i borneol. Utvrđeno je da eterično ulje ružmarina bogato mircenom ima jako antioksidativno djelovanje, dok eterično ulje ružmarina bogato  $\alpha$ -pinenom ima antioksidacijsko djelovanje protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Ojeda-Sana i sur., 2013). Pregledom literature utvrđena je i povezanost utjecaja fenolnih spojeva na antioksidacijsku aktivnost, gdje se ističu karnozna kiselina i karnozol. Oba spoja su inhibitori peroksidacije lipida

u liposomalnim i mikrosomalnim sustavima, dobri su hvatači  $\text{CCl}_3\text{O}_2$  (peroksilnih radikala), reduciraju citokrom c i hvataju hidroksilne radikale (Aruoma i sur., 1992).

#### 2.4.2. Eterično ulje i hidrolat lovora

Eterično ulje lovora dobiva se iz listova biljke lovor (lat. *Laurus nobilis*) (slika 2) koje pripada porodici *Lauraceae*, a kao nusprodukt nastaje hidrolat. Kemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata lovora ovisi o procesu destilacije koji se koristi za ekstrakciju, te različitih organa biljke, stoga udio određenih spojeva u ekstraktu lovora može se razlikovati (Awada i sur., 2023). Eterično ulje i hidrolat lovora sličnog su kemijskog sastava, a kao dominantna skupina spojeva su hlapljivi spojevi. U eteričnom ulju dominiraju hlapljivi spojevi poput monoterpenih i seskviterpenih ugljikovodika, dok u hidrolatu dominiraju hlapljivi spojevi ali u manjoj mjeri nego u eteričnom ulju poput oksigeniranih monoterpena i oksigeniranih seskviterpena. Prema Miljanović i sur. (2020) u eteričnom ulju lovora identificirana su 84 kemijska spoja. Najzastupljeniji su monoterpeni:  $\alpha$ -terpenil acetat (18 %), 1,8-cineol (27 %) i linalol (8 %). Među seskviterpenima dominiraju veridiflorol (4 %), biciklogermakren (1,4 %) i  $\beta$ -elemen (1,6 %). Neki od drugih spojeva bili su eugenol (9 %) i metileugenol (10 %). Hidrolati obično sadrže < 1 g/L u vodi topivih hlapivih organskih spojeva koji potječu iz eteričnog ulja i ostaju otopljeni u vodenoj fazi, ali je njihov kemijski sastav pomaknut prema dominaciji hidrofilnijih spojeva u odnosu na sastav eteričnih ulja. Prema literaturi za hidrolat lovora (Miljanović i sur., 2023) pokazano je da hidrolat sadrži veći udio 1,8-cineola (47 %) za razliku od eteričnog ulja lovora koje sadrži 20 %. Nadalje, spojevi koji su bili dominantni u značajnoj količini u eteričnom ulju lovora poput monoterpena  $\alpha$ -terpenil acetata, seskviterpena viridiflorola, trans-kariofilena, biciklogermakrena i  $\beta$ -elemena nisu bili prisutni u hidrolatu lovora ili su bili prisutni u vrlo malim količinama, ispod razine detekcije. Prema istraživanjima, kemijski sastav eteričnog ulja lovora se razlikuje, glavne komponente eteričnog ulja lovora su 1,8-cineol (42,1 %), linalol (11,9 %) i  $\alpha$ -terpineol acetat (9,3 %) (Olmedo i sur., 2015). Udio fenolnih spojeva u hidrolatu niži je nego udio fenolnih spojeva u eteričnom ulju lovora, a od fenolnih spojeva u hidrolatu lovora istaknuli su se eugenol i metileugenol (Miljanović i sur., 2023).



**Slika 2.** List lovora (Britannica, 2023)

#### 2.4.2.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata lovora

Kemijski sastav eteričnog ulja lovora različite koncentracije ima različite mehanizme inhibicije koji mogu utjecati na raznolikost patogena promjenom propusnosti membrane, denaturacijom proteina te inhibicijom enzima. Sinergija između terpena, 1,8-cineola te monoterpena kao što su kamfen i  $\alpha$ -pinen daje eteričnom ulju lovora učinkovito antibakterijsko djelovanje (Siriken i sur., 2018). Eterično ulje lovora pokazuje inhibicijski učinak na peroksidaciju linolne kiseline. Naime, najvažnija reakcija u peroksidaciji lipida je autooksidacija nezasićenih masnih kiselina, za koju je poznato da se odvija lančanom reakcijom radikala. Analizirana eterična ulja lovora dobivena su ekstrakcijom mikrovalovima na dvije razine snage i vodenom destilacijom kako bi se utvrdio njihov inhibitorni učinak na peroksidaciju linolne kiseline. Eterična ulja lovora ekstrahirana metodom mikrovalova pri 100 %-tnoj i 40 %-tnoj razini snage inhibirala su peroksidaciju linolne kiseline za postotak od  $70,57 \pm 5,89$  odnosno  $63,53 \pm 17,8$ . Iako je eterično ulje dobiveno metodom hidrodestilacije pokazalo veći inhibitorni učinak na peroksidaciju linolne kiseline ( $89,18 \% \pm 1,02 \%$ ) od onih dobivenih metodom ekstrakcije mikrovalovima, ta razlika nije statistički značajna. Također, rezultati su pokazali da je 1 g ekstrakta lovora dobivenog vodenom destilacijom jednako učinkovit kao 212 mg Troloxa u prevenciji peroksidacije lipida (Nehir El i sur., 2014).

#### 2.4.3. Eterično ulje i hidrolat bosiljaka

Eterično ulje bosiljka dobiva se iz listova biljke bosiljak (lat. *Ocimum basilicum*) koja pripada porodici *Lamiaceae*, odnosno porodici metvice, a nusprodukt koji nastaje naziva se hidrolat. Najvažniji dio bosiljka je list (slika 3) koji se koristi kao začim u kulinarstvu, kozmetičkoj industriji i u medicinske svrhe zbog svoga antikancerogenog, antimikrobnog, protuupalnog, antioksidativnog, antistresnog, antidijabetičkog djelovanja (Shahrajabian i sur., 2020). Eterično ulje i hidrolat bosiljka sličnog su kemijskog sastava, iako s druge strane hidrolat ima manje kemijskih spojeva od eteričnog ulja. Glavna komponenta eteričnog ulja i hidrolata bosiljka je linalol kojeg ima više u hidrolatu nego u eteričnom ulju. Prema literaturi, postotak linalola u eteričnom ulju iznosi 40,5 %, dok u hidrolatu iznosi 75,5 %. Neki od ostali spojevi detektirani u eteričnom ulju su epi- $\alpha$ -kadinol (6,1 %), germakren D (5,3 %)  $\beta$ -elemen (5,3 %),  $\gamma$ -kadinen (5,2 %), a u hidrolatu 1,8-cineol (5,5 %) i terpinen-4-ol (5,4 %) (Šovljanski i sur., 2022). Prema drugim autorima glavne komponente eteričnog ulja bosiljka su linalol (31,65 %), estragol (17,37 %), metil-cinamat (15,14 %), eukaliptol (4,04 %), eugenol (3,59 %) te  $\gamma$ -kadinen (2,42 %) (Ahmed i sur., 2019).





**Slika 3.** List bosiljka (Ollerton, 2022)

#### 2.4.3.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata bosiljka

Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata bosiljka ovisi o njihovom kemijskom sastavu, a ponajviše udjelu hlapljivih spojeva gdje je glavna komponentna eteričnog ulja bosiljka monoterpenski spoj linalol (da Silva i sur., 2022). Uklanjanje slobodnih radikala vrlo je važno prilikom konzerviranja hrane i prehrambenih proizvoda. Test neutralizacije radikala (DPPH test) najčešća je *in vitro* metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. U istraživanju koje su provodili Stanojević i sur. (2017) ispitivano je djelovanje eteričnog ulja bosiljka kao donora vodikovih atoma ili elektrona u redukciji DPPH radikala. Kemijski sastav eteričnog ulja bosiljka sadržavao je 31,6 % linalola, 23,8 % *p*-alilfenola te 0,1 % eugenola. Rezultati su pokazali da je eterično ulje bosiljka uspjelo smanjiti stabilan ljubičasto obojeni DPPH radikal u žuto obojeni DPPH-H tijekom 90 minuta koliko je trajala inkubacija. Stupanj neutralizacije DPPH radikala ovisi o koncentraciji eteričnog ulja i vremenu inkubacije. Za ne inkubirane uzorke neutralizacija DPPH radikala pokazala je najniži stupanj dok je najviša antioksidativna aktivnost eteričnog ulja bosiljka izmjerena nakon 90 minuta inkubacije. Rezultati pokazuju da bi eterično ulje bosiljka bila sigurna alternativa sintetičkim antioksidansima u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Pregledom literature dokazalo se da je eterično ulje bosiljka sa visokim sadržajem linalola ( 56,7 %) pokazalo veću aktivnost hvatanja radikala od prethodnog istraživanja u kojem se sadržaj linalola iznosio 31,6 %. Rezultati pokazuju da antioksidativno djelovanje eteričnog ulja bosiljka uglavnom ovisi o njegovom kemijskom sastavu (Hussain i sur., 2008).

#### 2.4.4. Eterično ulje i hidrolat kadulje

Eterično ulje i hidrolat kadulje dobiva se iz lista biljke kadulja (lat. *Salvia officinalis*) (slika 4) koja pripada porodici *Lamiaceae* i aromatična je biljka porijeklom iz mediteranskih krajeva (Walker i sur., 2004). Eterično ulje i hidrolat kadulje sličnog su kemijskog sastava koji čine

hlapljivi kemijski spojevi poput oksigeniranih monoterpena, seskviterpena i njihovih derivata. Udjeli hlapljivih komponenti poput monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika zastupljeni su u većoj količini u eteričnom ulju, dok se u hidrolatu ističu oksigenirani monoterpeni i oksigenirani seskviterpeni. Miljanovic i sur. (2020) identificirali su 71 kemijski spoj u eteričnom ulju kadulje među kojima su se najviše istaknuli oksigenirani monoterpeni poput  $\alpha$ -tujona (23 %),  $\beta$ -tujona (10 %), kamfora (17 %), borneola (8 %) te 1,8-cineola (8 %). Predstavnici seskviterpena su manol (14 %) i veridiflorol (14 %), a od fenolnih spojeva istaknuli su eugenol (3 %) te metileugenol (2 %). U hidrolatima kadulje prema Miljanovic i sur. (2023) također su se istaknuli oksigenirani monoterpeni poput kamfora (30,95 – 34,88 %), 1,8-cineola (9,20 – 17,11 %),  $\alpha$ -tujona (6,57 – 16,48 %) i borneola (9,60 – 14,68 %). Kadulja je bogata flavonoidima i polifenolnim spojevima kao što su karnozinska, *p*-hidrobenzojeva, ružmarinska, vanilinska, ferulinska i kofeinska kiselina koje posjeduju snažno antioksidativno i antibakterijsko djelovanje. Većina fenolnih spojeva roda *Salvia* su derivati kafeinske kiseline koja je gradivni blok raznih biljnih metabolita, a javlja se uglavnom u obliku dimera u formi ružmarinske kiseline (Hamidpour i sur., 2014).



**Slika 4.** List kadulje (Iannotti, 2022)

#### **2.4.4.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata kadulje**

Proučiti kemijski sastav ljekovitog bilja koje se tradicionalno koristi u medicini važno je za predviđanje i tumačenje njihove potencijalne biološke učinkovitosti. Fenolni spojevi u koje se ubrajaju fenolne kiseline te flavonoidi obično su odgovorni za antioksidativna svojstva kadulje i za njezinu visoku i raznoliku biološku aktivnost. Biljka kadulja poznata je kao prirodna i jedan od najbogatijih izvora antioksidansa, a njezina ljekovita vrijednost izravno je povezana s tim svojstvom (Pereira i sur., 2018). Usporedbu antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja kadulje istraživali su Kammoun El Euch i sur. (2019). Rezultati su pokazali da eterično ulje kadulje učinkovito uklanja slobodne DPPH radikale s vrijednošću IC<sub>50</sub> od oko 8,31 ± 0,55 mg/L koja se može usporediti s onom standarda askorbinske kiseline (IC<sub>50</sub>=4,68 ± 0,12 mg/L). Aktivnost eteričnog ulja kadulje pripisuje se njezinom kemijskom sastavu u kojem dominira 1,8-cineol (22,22 %), te spojevi  $\alpha$ -pinen (1,71 %), terpinen-4-ol (0,8 %) i linalol (0,28 %) koji se smatra

jednim od najjačih hvatača slobodnih radikala. Visoka antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja kadulje je od velikog interesa jer može zaštititi hranu od toksičnih učinaka oksidansa. Što se tiče njegove sigurnosti pri uporabi, u slučaju produljene uporabe ili nakon predoziranja eteričnim uljem kadulje mogu se pojaviti neki neželjeni učinci. Negativno djelovanje eteričnog ulja kadulje posljedica je njegovog izravnog učinka (u dozama većim od 0,5 g/kg) na živčani sustav. Kamfor, tujon i terpeni smatraju se najotrovnijim spojevima kadulje. Ovi spojevi mogu izazvati toksične učinke na fetus i novorođenče. Stoga se konzumacija eteričnog ulja kadulje ne preporučuje tijekom trudnoće i dojenja (Mills i Bone, 2005).

#### 2.4.5. Eterično ulje i hidrolat komorača

Eterično ulje komorača dobiva se iz cvjetova biljke komorač (lat. *Foeniculum vulgare*) (slika 5) koje pripada porodici *Apiaceae* i karakteristična je za područje Sredozemlja, a kao nusprodukt vodene destilacije nastaje hidrolat. Eterično ulje komorača zbog svojih antioksidativnih, antibakterijskih i antifungalnih svojstava koristi se u prehrani kao dodatak kruhu, ribi, salatama, juhama i siru. Primjenu ima i u industriji parfema, proizvodnji sapuna, kozmetike te farmaciji zbog antidijabetičkih, antitrombičkih, kardiovaskularnih te antikancerogenih svojstava (Sarma i sur., 2014). Eterično ulje i hidrolat komorača vrlo su sličnog kemijskog sastava kojeg čine hlapljivi kemijski spojevi poput monoterpena, seskviterpena i njihovih derivata, a upravo oni su odgovorni za njihova svojstva. Eterično ulje komorača prema studiji koju su radili Roby i sur. (2012) sastoji se u najvećoj mjeri od oksigeniranih monoterpena trans-anetola (56,4 %), fenkona (8,26 %), estragola (5,21 %), metil-*p*-alilfenola (5,2 %) i ugljikovodičnog monoterpena limonena (4,2 %). Prema nekim autorima sastav hidrolata komorača u najvećoj mjeri čine oksigenirani monoterpeni od 86,48 %, od kojih su prisutni trans-anetol (76,82 %) i fenkon (8,09 %). Monoterpeni ugljikovodici su zastupljeni u nižem udjelu od 13,52 %  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -felandren i limonen. Eterično ulje i hidrolat komorača sadrži znatno manji udio fenolnih spojeva u odnosu na hlapljive spojeve. Glavni fenolni spojevi eteričnog ulja i hidrolata komorača su klorogena kiselina, kafeinska kiselina i ferulinska kiselina, te kvercetin i izokvercetin (Mahai i sur., 2023).



**Slika 5.** Cvijet komorača (Pxfuel, 2024)

### *2.3.5.1. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata komorača*

Biljka komorač poznata je kao izvrstan izvor prirodnih antioksidansa i uporabe u prehrani. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata komorača pripisuje se njegovom kemijskom sastavu, visokom udjelu hlapljivih kemijskih spojeva od kojih se najviše ističe trans-anetol (Mahai i sur., 2023). Eterično ulje komorača pokazuje visoku antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s butilhidroksianizolom (BHA) i butilhidroksitoluenom (BHT) kao i fenolni spojevi u koje spadaju ružmarinska kiselina, kvercetin-3-O-galaktozid i kamferol-3-O-glukozid. Eterično ulje komorača koje je pokazalo i antioksidativnu aktivnost i antimikrobnu aktivnost sadržavalo je veću koncentraciju trans-anetola (70,1 %) (He i Huang, 2011). U drugoj studiji eterično ulje i hidrolat komorača pokazuju sposobnost inhibitora slobodnih radikala kao i primarnog antioksidansa koji reagira sa slobodnim radikalima, što može ograničiti oštećenja koja uzrokuju slobodni radikali u ljudskom tijelu (Shahat i sur., 2011).

## **2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST**

### 2.5.1. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi prisutni u namjernicama ili ljudskom tijelu u vrlo niskim koncentracijama, a njihova uloga je neutralizacija slobodnih radikala u biološkim stanicama koje imaju negativan utjecaj na žive organizme. Oni odgađaju, neutraliziraju ili sprječavaju oksidativne procese djelujući kao donori ili akceptori slobodnih radikala stvarajući stabilnije radikale (Hurrel, 2003). Postoje različite podijele antioksidansa. Prva podjela je na primarne i sekundarne, dok je druga na enzimске i ne-enzimске antioksidanse. Uloga primarnih antioksidansa je reakcija s lipidnim radikalima tako što zaustavljaju lanac reakcija i pretvaraju ih u stabilne spojeve. Primarni antioksidansi imaju uglavnom fenolnu strukturu i uključuju sljedeće: antioksidativne minerale, antioksidativne vitamine, flavonoide, katehine, karotenoide,  $\beta$ -karoten, likopen, diterpen i njihove derivate. Sekundarni antioksidansi imaju ulogu hvatanja slobodnih radikala i zaustavljanje lančane reakcije (Ratnam i sur., 2006). Djeluju različitim mehanizmima kao što su vezanje metalnih iona, uklanjanje reaktivnih vrsta kisika, pretvaranje hidroperoksida u neradikalne vrste, a predstavnici su butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT) i propil galat (PG). Neki od enzimskih i ne-enzimskih antioksidansa endogeno se proizvode u stanicama, a uključuju enzime, molekule niske molekulske mase te kofaktore. Većina ne-enzimskih antioksidansa se dobiva iz prehrambenih izvora kao što su polifenoli među koje se svrstavaju fenolne kiseline i flavoniodi te od ostalih, vitamini, karotenoidi, minerali. Brojna istraživanja pokazuju da antioksidansi igraju bitnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja, prevenciji i liječenju bolesti, zbog svoje sposobnosti smanjenja oksidativnog stresa. Učinkovitost antioksidativnih spojeva ovisi o nekoliko čimbenika, a najvažniji su strukturna svojstva, temperatura, karakteristike supstrata podložnog oksidaciji,

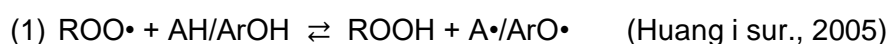
koncentracija te kinetika reakcije. U normalnim okolnostima, brzina i amplituda stvaranja oksidansa uravnotežena je s brzinom njihovog uklanjanja, a gubitak te ravnoteže rezultira oksidativnim stresom koji ima negativan utjecaj na ljudsko zdravlje uzrokujući razne bolesti (Moharram i Youssef, 2014).

### 2.5.2. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti

Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti temelje se na kemijskim reakcijama, a procjena kinetike ili postizanja stanja ravnoteže oslanja se na spektrofotometriju. Prema kemijskim reakcijama koje mogu biti uključene, testovi su podijeljeni u 3 kategorije. Prva kategorija su metode koje se temelje na reakciji prijenosa atoma vodika (engl. *hydrogen atom transfer, HAT*), druga kategorija su metode koje se temelje na prijenosu jednog elektrona (engl. *Single electron transfer, SET*) i treća kategorija je kombinacija dvaju prethodno navedenih metoda (HAT/SET). Krajnji rezultat je isti, bez obzira na mehanizam reakcije, iako su kinetika i stupnjevi reakcije različiti (Munteanu i Apetrei, 2021).

#### 2.5.2.1. Hydrogen atom transfer

HAT testovi temelje se na prijenosu atoma vodika od antioksidansa do slobodnog radikala kako bi neutralizirali njegovo djelovanje. Kemijska jednadžba (1) prikazuje mehanizam reakcije gdje se atom vodika (H) fenola (ArOH) prenosi na peroksilni radikal. Arioksilni radikal (ArO•) nastao reakcijom fenola (ArOH, antioksidans) s peroksilnim radikalom (ROO•) je stabiliziran rezonancijom te zajedno sa AH čini zaštićene molekule. Novi učinkoviti fenolni antioksidans trebao bi brže reagirati od biomolekula (zaštićene molekule) sa slobodnim radikalima kako bi dao zaštitni učinak protiv njihove oksidacije (Huang i sur., 2005).



U HAT metode ubrajaju se test kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorption Capacity, ORAC*), test antioksidativnog parametra hvatanja ukupnih peroksilnih radikala (engl. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP*) i test ukupnog kapaciteta hvatanja oksiradikala (engl. *Total Oxyradical Scavenging Capacity, TOSC*) (Huang i sur., 2005).

##### 2.5.2.1.1. Oxygen Radical Absorption Capacity test

ORAC test mjeri sposobnost cijepanja lančane reakcije radikala pomoću antioksidansa kroz praćenje inhibicije oksidacije peroksilnog radikala. Peroksilni radikali karakteriziraju se kao slobodni radikali koji prevladavaju u oksidaciji lipida u biološkim sustavima, ali i u hrani, u fiziološkim uvjetima. Peroksilni radikal reagira s fluorescentnim uzorkom što dovodi do gubitka fluorescencije, registriranog na fluorimetru. Ova metoda koristi tehniku površine ispod krivulje u prisutnosti i u odsutnosti antioksidansa. Kao referentni spoj koristi se standardni

antioksidans, tipično trolox, a ORAC vrijednosti procijenjenih antioksidansa opisane su kao trolox ekvivalent (Huang i sur., 2005).

#### 2.5.2.1.2. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter test*

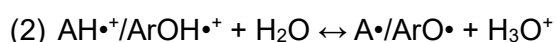
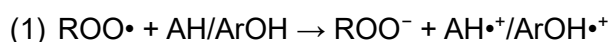
TRAP test temelji se na sposobnosti antioksidansa da inhibiraju reakciju između peroksilnih radikala i ciljne molekule, što je u početku predstavljalo potrošnju O<sub>2</sub> (kao uzorka) u procesu peroksidacije potaknutom toplinskom razgradnjom 2,2' azobis(2-amidinopropan)(ABAP). Vrijeme usporavanja apsorpcije O<sub>2</sub>, tj. period indukcije, može se kvantitativno izmjeriti i koristiti za izražavanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzoraka kao TRAP vrijednost (Munteanu i Apetrei, 2021).

#### 2.5.2.1.3. *Total Oxyradical Scavenging Capacity test*

TOSC test temelji se na inhibiciji stvaranja etilena (kontrolna reakcija se prati plinskom kromatografijom) u prisutnosti antioksidativnih spojeva koji se natječu s α-keto-γ-betiolmaslačnom kiselinom (KMBA) za supstrat. Ovaj test koristi površinu ispod krivulje koncentracije etilena u ovisnosti o vremenu reakcije (do 300 min) (Regoli i sur., 1999).

#### 2.5.2.2. *Single electron transfer metode*

SET metode su testovi temeljeni na prijenosu jednog elektrona, a temelje se na sposobnosti antioksidansa da reducira metalne ione, karbonilne skupine i slobodne radikale prvenstveno na deprotonaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcionalne skupine te su ovisne o pH pri kojem se reakcija odvija. Jednadžbe (1), (2), i (3) prikazuju mehanizam na kojem se temelje ove metode. Ariloksilni radikal (ArO•) naknadno se oksidira u odgovarajući kinon (Ar = O). Što je ariloksilni radikal stabiliziraniji, to je lakša oksidacija iz ArOH u Ar = O zbog smanjenog redoks potencijala. Antioksidativno djelovanje u ovim testovima često se simulira s prikladnim fluorescentnim ili obojenim uzorkom umjesto peroksilnih radikala.



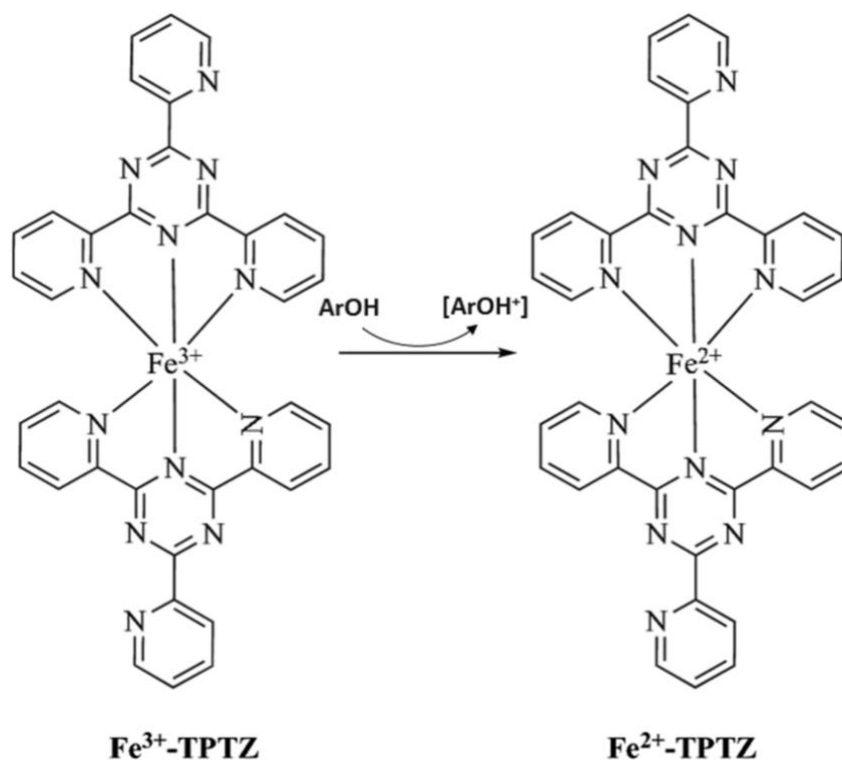
U SET metode ubrajaju se test ferri redukcije antioksidativne snage (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP*) i test smanjenja bakrenog antioksidativnog kapaciteta (engl. *reducing the cupric antioxidant capacity, CUPRAC*) (Apak i sur., 2016).

#### 2.5.2.2.1. *Ferric Reducing Antioxidant Power metoda*

FRAP metoda vrlo je jednostavna, brza i isplativa metoda kojom se mjeri antioksidacijska aktivnost uzorka te ne zahtjeva specijaliziranu opremu. Temelji se na prijenosu elektrona sa

željezo(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ) na željezo(II)-2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleks (Fe(II)-TPTZ) intenzivnog plavog obojenja s apsorpcijskim maksimumom pri 593 nm (Antolovich i sur., 2002). Na slici 6 prikazana je osnovna reakcija redukcije na kojoj se temelji FRAP metoda. Za razliku od svih ostalih SET metoda FRAP metoda zahtjeva specifične uvjete kao što su temperatura i kiseli medij pa se reakcija odvija pri pH 3,6 i temperaturi od 37 °C kako bi se održala topljivost željeza, smanjio ionizacijski potencijal koji pokreće prijenos elektrona te povećao redoks potencijal (Hegerman i sur., 1998).

Izvorni FRAP test koristi tripiridiltriazin (TPTZ) kao vezajući ligand za željezo ion, također, jedna od alternativa je korištenje ferozina te kalijevog fericijanida kao liganda za vezanje iona željeza. Kalijev fericijanid u novije vrijeme najčešći je korišteni ligand, a konačni plavo obojeni produkt može biti kvantificiran spektrofotometrijski i pokazuje reducirajuću moć antioksidansa. Nastanak plavo obojenog produkta može se dogoditi na dva načina sa istim rezultatom, u prvom slučaju antioksidansi mogu reducirati  $\text{Fe}^{3+}$  u otopini na  $\text{Fe}^{2+}$ , koji veže fericijanid da bi se dobilo plavo obojenje ili u drugom slučaju reducirati fericijanid u ferocijanid, koji potom veže  $\text{Fe}^{3+}$  u otopini te tvori plavo obojenje (Berker i sur., 2010).



**Slika 6.** Reakcija redukcije FRAP metode (Shi i sur., 2022)

#### 2.5.2.2.2. *Reducing the cupric antioxidant capacity metoda*

CUPRAC metoda za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji bakra prilikom čega mu se mijenja oksidacijsko stanje iz  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$ . Prilikom provođenja testa za formiranje bakar-ligand koristi ligand neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) kako bi se olakšalo mjerenje apsorbancije pri 450 nm gdje kompleks postiže apsorpcijski maksimum. Primjenjiva je i za lipofilne i hidrofilne antioksidanse stoga može naći široku primjenu (Ozyürek i sur., 2008).

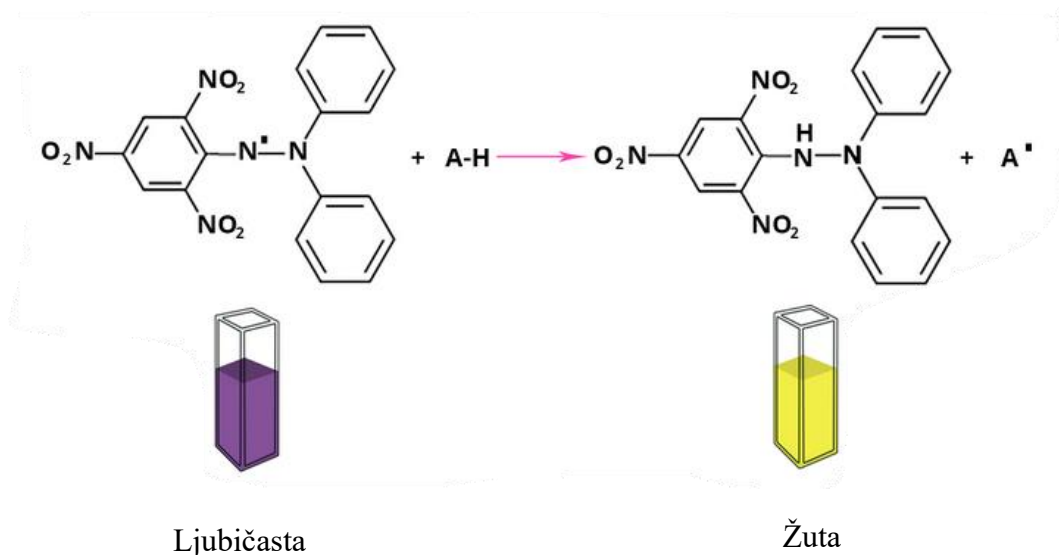
#### 2.5.2.3. *HAT/SET metode*

HAT/SET testovi su miješani testovi koji se temelje na eliminaciji stabilnog kromofora kao što su ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) gdje mehanizmi prijenosa elektrona s protonom mogu imati različite uloge u različitim omjerima ovisno o reakcijskim uvjetima kao što su otapalo i pH vrijednost. Testovi mješovitog načina rada (HAT/SET) uglavnom uključuju ABTS/Trolox ekvivalent antioksidativnog kapaciteta (TEAC, engl. *The Trolox equivalent antioxidant capacity*), test neutralizacije radikala (DPPH) i test neutralizacije radikala N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorida (DMPD) (Munteanu i Apetrei, 2021).

##### 2.5.2.3.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil metoda

DPPH metoda je brza, jednostavna, točna i jeftina metoda za mjerenje antioksidativne aktivnosti pojedinačnih spojeva ili njihovih smjesa. Temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju promjene koncentracije neizreagiranog DPPH radikala iz reakcije DPPH radikala s antioksidansom. DPPH test temelji se na doniranju elektrona iz antioksidansa kako bi se neutralizirao DPPH radikal. Količina neizreagiranog DPPH radikala mjera je antioksidativne aktivnosti spoja ili smjese. Mehanizam reakcije i promjena boje iz ljubičaste u žutu prikazana je na slici 7, a maksimalna vrijednost apsorpcije DPPH radikala je pri 517 nm. Radikal je topiv u različitim organskim otapalima, ali ne i u vodi. Najčešće korištena otapala za određivanje aktivnosti hvatanja radikala prema DPPH su metanol i etanol ili njihova smjesa (Marinova i Batchvarov, 2011).





**Slika 7.** Mehanizam kemijske reakcije DPPH metode (gore) i promjena boje reakcije (dolje) (Chimactiv, 2024)

## 2.6. POSTUPCI IZOLACIJE ETERIČNOG ULJA

### 2.6.1. Postupak destilacije

Najraširenija metoda za ekstrakciju biljnog materijala je destilacija vodenom parom (engl. *steam distillation*, *SD*). Udio eteričnih ulja ekstrahiranih destilacijom vodenom parom je oko 93 %, dok se preostalih 7 % može ekstrahirati drugim metodama. Biljni materijal iz kojeg želimo ekstrahirati eterično ulje ili druge aromatske spojeve stavi se u kipuću vodu ili se zagrijava na pari. Primjenjena toplina glavni je uzrok pucanja i razgradnje stanične strukture biljnog materijala te se potom oslobađaju aromatski spojevi ili eterična ulja iz biljnog materijala. Temperatura zagrijavanja mora biti dovoljna da se biljni materijal razgradi i oslobode željene komponente. Druga metoda destilacije je vodena destilacija (engl. *hydrodistillation*, *HD*) koja je postala standardna metoda ekstrakcije eteričnog ulja iz biljnog materijala kao što je list, drvo ili cvijet, a često se koristi za izolaciju netopivih prirodnih proizvoda s visokim vrelištem. Proces započinje uranjanjem biljnog materijala u vodu, nakon čega slijedi kuhanje. Ova metoda štiti ekstrahirana ulja do određenog stupnja jer okolna voda djeluje kao barijera za sprječavanje pregrijavanja. Para vode i para eteričnog ulja kondenziraju se u vodenu frakciju (Tongnuanchan i Benjakul, 2014).

### 2.6.2. Ekstrakcija pomoću organskih otapala

Ekstrakcija pomoću organskih otapala primjenjuje se za lomljive i osjetljive cvjetne materijale koji nemaju visoku tolerantnost na toplinu parne destilacije. Za ekstrakciju se koriste razna otapala poput acetona, heksana, petrolej etera, metanola ili etanola. Proces započinje miješanjem otapala s biljnim materijalom, potom se sve zagrijava kako bi se ekstrahiralo

eterično ulje nakon čega slijedi filtracija. Filtrat se hladi i koncentrira kao posljedica isparavanja zagrijanog otapala. Kao produkt se prvotno dobije koncentrat koji je smjesa voska, mirisa i eteričnog ulja, potom se miješa s čistim alkoholom kako bi se ekstrahiralo ulje, destilira na niskim temperaturama kako bi ispario alkohol koji nosi sa sobom ostale mirise te kao krajnji produkt se dobije aromatično čisto ulje. Negativna strana metode je dugotrajnost, a ulja dobivena ekstrakcijom organskim otapalima skuplja od ulja dobivenih drugim metodama. Također, u konačnom proizvodu mogu se zadržati ostaci otapala zbog nepotpunog uklanjanja što može uzrokovati alergije, toksičnost i utjecati na imunološki sustav (Tongnuanchan i Benjakul, 2014).

### 2.6.3. Ekstrakcija mikrovalovima

Ekstrakcija mikrovalovima (engl. *Solvent-free microwave extraction, SFME*) brza je metoda izolacije eteričnog ulja iz aromatičnog bilja, začina i suhih sjemenki. Metoda je nastala radi nedostataka konvencionalnih metoda koje su imale nisku učinkovitost, gubitke hlapljivih spojeva zbog povećane temperature, dugo vrijeme ekstrakcije, razgradnju nezasićenih i esterskih spojeva toplinskim ili hidrolitičkim učincima. Ova metoda ima nekoliko prednosti, uključujući veći prinos i selektivnost, kraće vrijeme i ekološku prihvatljivost. Proces se temelji na kombinaciji zagrijavanja mikrovalovima i suhe destilacije pri atmosferskom tlaku bez dodatka otapala ili vode. Izolacija i koncentracija hlapljivih spojeva provodi se u jednoj fazi (Tongnuanchan i Benjakul, 2014).

### 2.6.4. Ekstrakcija superkričnim CO<sub>2</sub>

Ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) je najčešće korištena superkrična tekućina, koja se u uvjetima visokog tlaka pretvara u tekućinu. Kao takva se može koristiti kao vrlo inertan i siguran medij za ekstrakciju aromatskih molekula iz sirovog materijala. U konačnom proizvodu za razliku od nekih ostalih metoda nema ostataka otapala jer se tekući CO<sub>2</sub> jednostavno pretvara u plin i isparava pod normalnim atmosferskim tlakom i temperaturom (Tongnuanchan i Benjakul, 2014).

## 2.7. PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

### 2.7.1. Eterična ulja kao prirodni konzervansi i primjena u aromatiziranju hrane

Eterična ulja su visoko hlapljive lipofilne smjese sekundarnih biljnih metabolita. Zahvaljujući svojim raznovrsnim bioaktivnim svojstvima, imaju snažna antimikrobna i antioksidativna djelovanja, što ih čini idealnim prirodnim alternativama sintetičkim prehrambenim aditivima u komercijalnoj prehrambenoj industriji. Trenutno, konzumacija pakirane hrane dovodi do povećanja bolesti prenosivih hranom zbog upotrebe sintetičkih aditiva koji održavaju organoleptičku i mikrobiološku kvalitetu hrane. Primjena konzervirajućih svojstava eteričnih

ulja smatra se prirodnim rješenjem ovih problema. Eterična ulja ne samo da produžuju rok trajanja proizvoda, već služe i kao prirodne arome. Ona se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji, te se mogu ugraditi u materijale za pakiranje hrane kako bi se kontrolirali čimbenici koji uzrokuju kvarenje hrane (Saeed i sur., 2022). Eterično ulje samostalno ili u kombinaciji također se ugrađuje u materijal za pakiranje hrane kako bi se kontrolirali agensi koji kvare hranu. Korištenje biljnih ekstrakata, hidrolata i eteričnih ulja očekuje široku potrošnju u budućnosti zbog činjenice da hlapljiva ulja se smatraju prirodnom alternativom tradicionalnim konzervansima za hranu i mogli bi se koristiti za povećanje sigurnost hrane i roka trajanja (Mahai i Popa, 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za izolaciju eteričnog ulja je korišten suhi biljni materijal. Biljni materijal (ružmarin, lovor i komorač) brani su na području Dalmacije te je nakon branja osušeni na sobnoj temperaturi te pakirani u polipropilenske vrećice, dok su bosiljak i kadulja kupljeni (Suban, Hrvatska) za potrebe analize ovog diplomskog rada.

##### 3.1.1. Kemikalije

Korištene kemikalije prilikom provođenja analitičkih metoda prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Folin-Ciocalteu reagens	Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
Galna kiselina (GAE)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natrijev karbonat	Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
Metanol (MeOH)	Termo Fisher Scientific, Maharashtra, Indrija
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Askorbinska kiselina (AAE)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Klorovodična kiselina (HCl)	Carlo Erba, Cornaredo, Italy
2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)	Alfa Aesar, Massachusetts, SAD
Željezo(III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Octena kiselina (ledena)	Macron, Mexico

Natrij acetat trihidrat	Lach-Ner, Zagreb, Hrvatska
Ledena octena kiselina	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Etanol	Termo Fisher Scientific, Maharashtra, Indija

### 3.1.2. Aparatura i pribor

Korištena aparatura prilikom provođenja analitičkih metoda prikazana je u tablici 2.

**Tablica 2.** Aparatura

Aparatura	Proizvođač
UV/Vis Spektrofotometar	Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
Analitička vaga	Libra Tehničar, Zagreb, Hrvatska
Magnetska mješalica (Vortex MS2 Minishaker IKA)	Labo moderne, Gennevilliers, France
Vodena kupelj	Boeco, Hamburg, Germany

Pribor:

- Aparatura po Clevengeru
- Tikvica s okruglim dnom (500 mL)
- Staklene kivete
- Epruvete
- Staklene čaše
- Plastične čaše
- Odmjerne tikvice (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Pipetman
- Pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)
- Mikropipeta (100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L)
- Plastična lađica za vaganje
- Špatula
- Stalak za epruvete

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

U okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL odvažuje se 20 g usitnjenog biljnog materijala i doda 250 mL pročišćene vode. Sadržaj tikvice zagrijava se u aparaturi po Clevengeru (slika 8) dok ne proključa, nakon čega vodena destilacija traje sljedeća 2 sata, uz održavanje stalne temperature. Nakon završetka vodene destilacije, sadržaj u tikvici ostavi se stajati 30 minuta te se izdvoji eterično ulje i hidrolat.

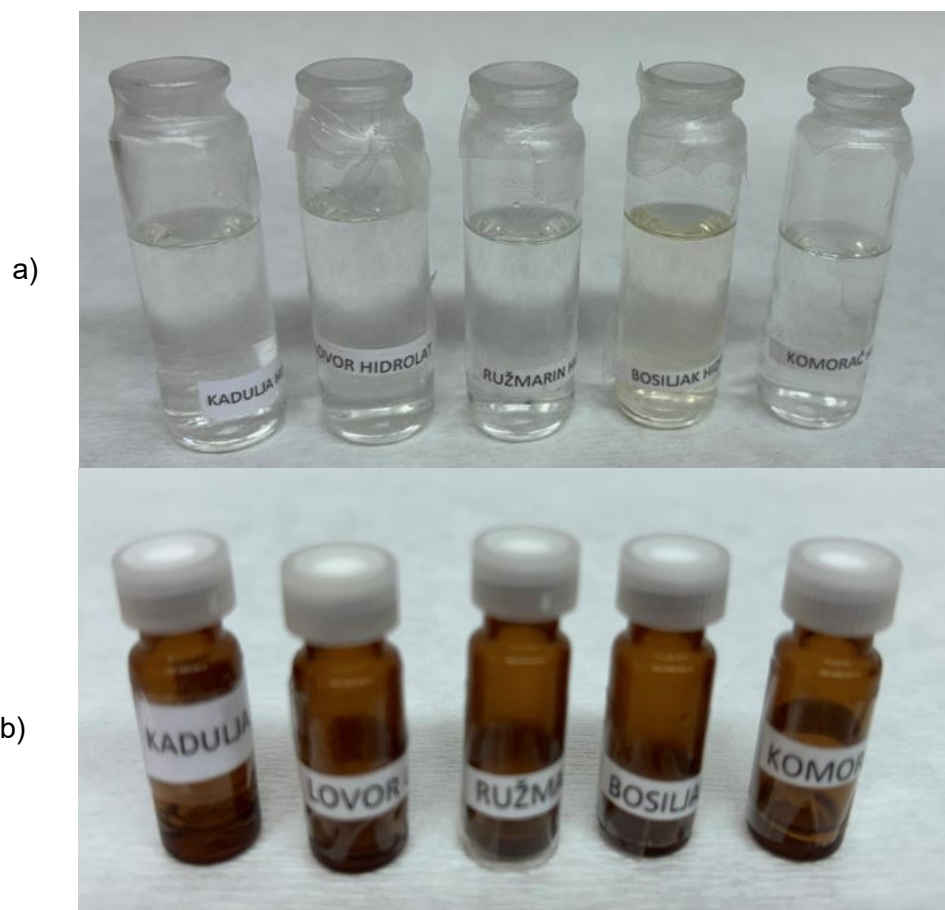


**Slika 8.** Aparatura po Clevengeru (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Čuvanje eteričnog ulja i hidrolata

Eterično ulje je nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru preneseno u smeđu staklenu falkonicu i čuvano u mraku na sobnoj temperaturi do 90 dana. Hidrolat je prenesen u

staklenu bočicu i čuvan na tamnom mjestu do 90 dana. Na slici 9 prikazani su uzorci dobivenih eteričnih ulja i hidrolata korištenih za analizu. Ukupni fenolni pojevi i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja i hidrolata je određena odmah nakon izolacije eteričnog ulja i hidrolata (0. dan), te nakon 7., 14., 21., 30., 60. i 90. dana.

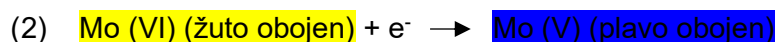


**Slika 9.** a) hidrolati; b) eterična ulja (vlastita fotografija)

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela ukupnih fenola

Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva hidrolata je proveden prema prethodno opisanoj metodi (Singleton i Rossi, 1965). Određivanje udjela ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem plavog obojenja pri 765 nm u alkalnim uvjetima. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdene i fosfomolibdene kiseline koje se prilikom oksidacije fenolnih spojeva reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid i poprimaju plavu boju (Waterhouse, 2002).

Fenolni spojevi sa većim brojem hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa dat će intenzivnije plavo obojenje. Glavno mjesto redukcije smatra se središnji molibdenov ion u kompleksu koji se prihvaćanjem elektrona doniranog fenolnim spojem reducira iz  $\text{Mo}^{6+}$  iona žute boje u  $\text{Mo}^{5+}$  iona plave boje. Kemijske jednačbe (1) i (2) prikazuju reakcije redukcije i nastanak plavog obojenja. Anionski derivati fosfomolibdene i fosfovolframove kiseline imaju tzv.  $\alpha$  - Kegginovu strukturu, dok plavi kompleks ima strukturu tzv. velikog kotača  $\text{Mo}_{154}$ . (Barrows i sur., 1985).



Za referentni standard uobičajeno se koristi galna kiselina, iako se mogu koristiti i kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, katehini te ferulna kiselina, a maseni udio ukupnih fenola izražen je kao ekvivalent galne kiseline na 100 g suhe biljke (Karadag i sur., 2009).

Priprema reagensa:

- 1) Natrijev karbonat (20 %, w/v)
- 2) Folin Ciocalteu reagens (1:2, v/v)
- 3) Galna kiselina ( $\gamma = 5$  g/L)

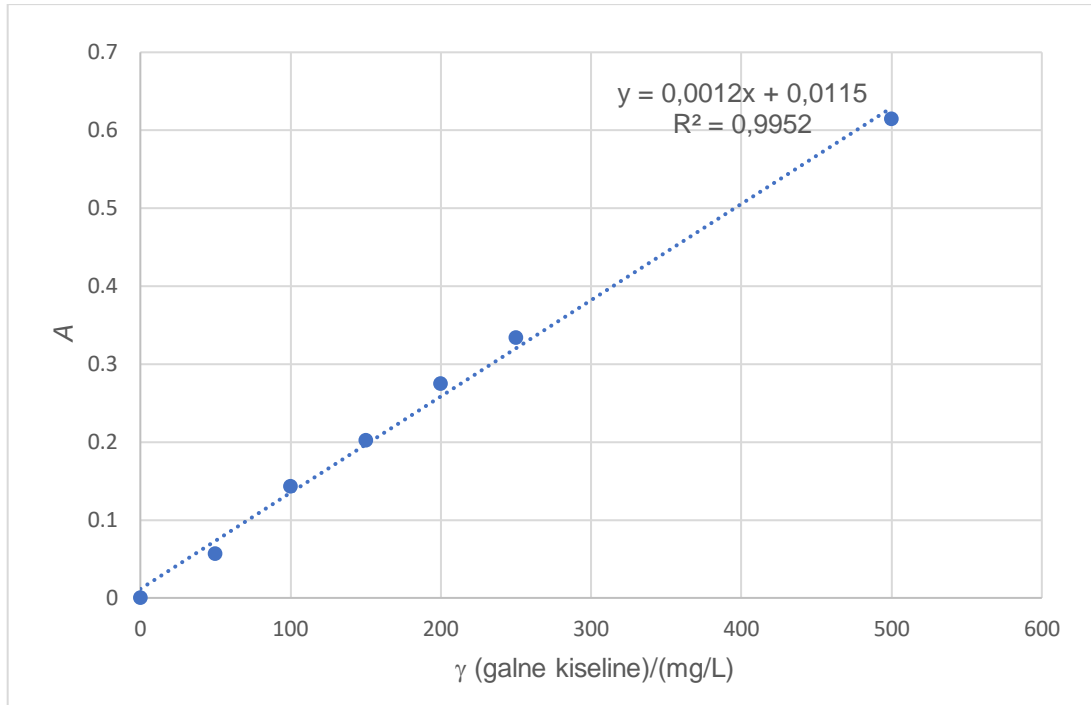
Za pripremu standardne otopine galne kiseline ( $\gamma = 5$  g/L) izvaže se 250 mg galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u tikvici od 50 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

### 3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline

Od otopine standarda galne kiseline ( $\gamma = 5$  g/L) se pripreme razrjeđenja standardnih otopina galne kiseline koncentracija 50, 100, 150, 200, 250 i 500 mg/L na način da se iz otopine standarda galne kiseline otpipetira redom 1, 2, 3, 4, 5 i 10 mL alikvot u tikvice od 100 mL koje se potom nadopune destiliranom vodom do oznake. U staklenu epruvetu se redom otpipetira 125  $\mu\text{L}$  standardne otopine galne kiseline (50 – 500 mg/L), doda se 625  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa, 10 mL destilirane vode te nakon 3 minute doda 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promješa pomoću Vorteksa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T = 50$  °C u vodenoj kupelji. Za slijepu probu uzima se 125  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon termostatiranja uzoraka mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm, a potom se iz izmjerenih vrijednosti nacrtava baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (slika 10). Na osi apscisa se nalaze masene koncentracije galne kiseline, a na osi ordinata vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri 765 nm. Iz jednačbe pravca



izračunaju se maseni udjeli ukupnih fenola izraženi kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/100 g suhe biljke).



**Slika 10.** Baždarni dijagram galne kiseline

#### 3.2.3.4. Postupak određivanja ukupnih fenola

Postupak određivanja ukupnih fenola jednak je postupku koji se koristi u izradi baždarnog dijagrama, razlika je jedino što se umjesto standarda galne kiseline koristi razrjeđeni uzorak, a za slijepu probu destilirana voda. Prilikom mjerenja masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatima ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača korišteni su nerazrjeđeni uzorci.

#### 3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja i hidrolata je određena FRAP i DPPH metodom.

##### 3.2.4.1. FRAP metodom

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-striazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju pri pH = 3,6, a mjerenje apsorbancije pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Priprema reagensa:

1) Askorbinska kiselina

Za pripremu standardne otopine askorbinske kiseline ( $\gamma = 100 \text{ g/L}$ ) izvaže se 10 g askorbinske kiseline te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

2) FRAP reagens

FRAP reagens priprema se na način da se u čaši volumena 100 mL pomiješa 50 mL acetatnog pufera ( $c = 0,3 \text{ M}$ ), 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL željezo (III)-klorida heksahidrata.

3) Acetatni pufer

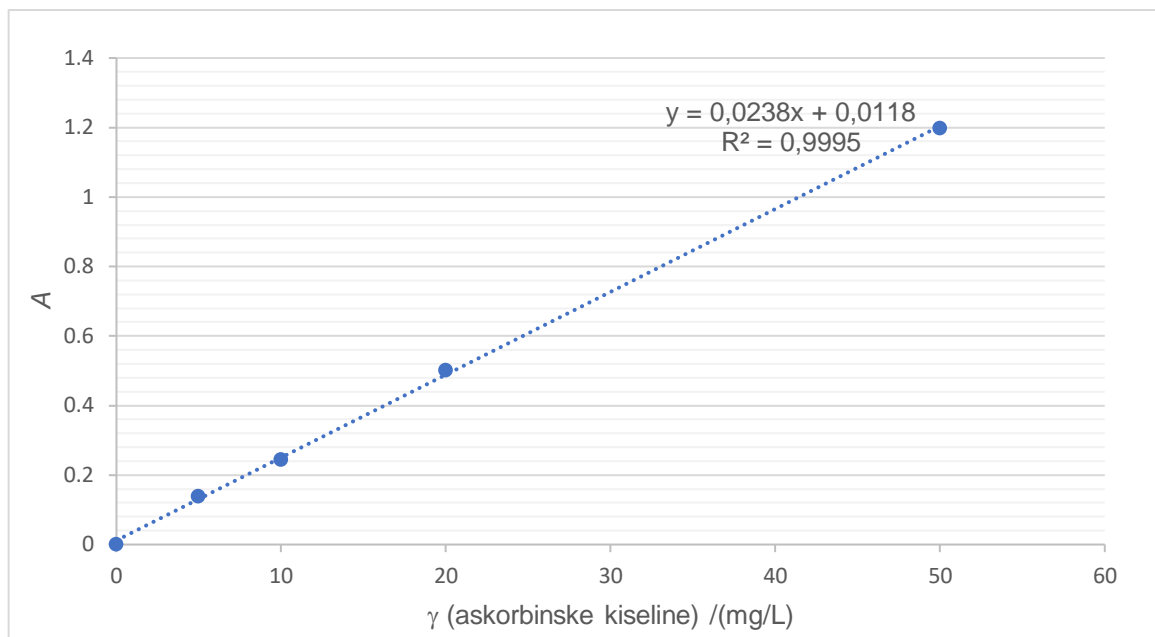
Za pripremu acetatnog pufera odvaže se 1,55 g natrij-acetat trihidrata te kvantitativno prenese u tikvicu volumena 500 mL u koju se potpuno otpipetira 8 mL ledene octene kiseline i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

4) TPTZ reagens

Za pripremu TPTZ reagensa odvaže se 0,078 g TPTZ-a u tikvicu od 25 mL te nadopuni do oznake 40 mM klorovodičnom kiselinom.

#### 3.2.4.1.2. Izrada baždarnog dijagrama askorbinske kiseline

Od otopine standarda askorbinske kiseline ( $\gamma = 100 \text{ mg/L}$ ) pripreme se razrjeđenja standardnih otopina askorbinske kiseline koncentracija 5, 10, 20, 50 mg/L na način da se redom otpipetira 0,5, 1, 2, 5 mL alikvota otopine askorbinske kiseline u odmjerne tikvice od 10 mL koje se potom nadopune destiliranom vodom do oznake. Od svakog razrjeđenja otpipetira se po 250  $\mu\text{L}$  uzorka i 4250  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, dobro promiješa te termostatira 10 minuta pri 37 °C. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu. Mjeri se apsorbancija pri 593 nm te se iz dobivenih vrijednosti crta baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost masene koncentracije askorbinske kiseline na apscisi te vrijednosti apsorbancije na ordinati (slika 11). Iz jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost izražena kao ekvivalent askorbinske kiseline (mg AAE/100 g suhe biljke).



**Slika 11.** Baždarni dijagram askorbinske kiseline za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

#### 3.2.4.1.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka jednak je postupku koji se koristi u izradi baždarnog dijagrama, razlika je jedino u tome što se umjesto standarda askorbinske kiseline koristi razrijeđeni uzorak eteričnog ulja i hidrolata pojedine biljke, a za slijepu probu otapalo destilirana voda za hidrolate, a za eterično ulje 96 %-tni etanol.

#### 3.2.4.2. DPPH metodom

Princip određivanja temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala u metanolnoj otopini, pri čemu dolazi do sparivanja nesparenog elektrona i prelaska stabilnog dušikovog radikala u ljubičastu boju. Reakcija se očituje promjenom boje iz ljubičaste u žutu, što se spektrofotometrijski prati kao pad apsorbancije pri 517 nm (Brand-Williams i sur., 1995).

Priprema reagensa:

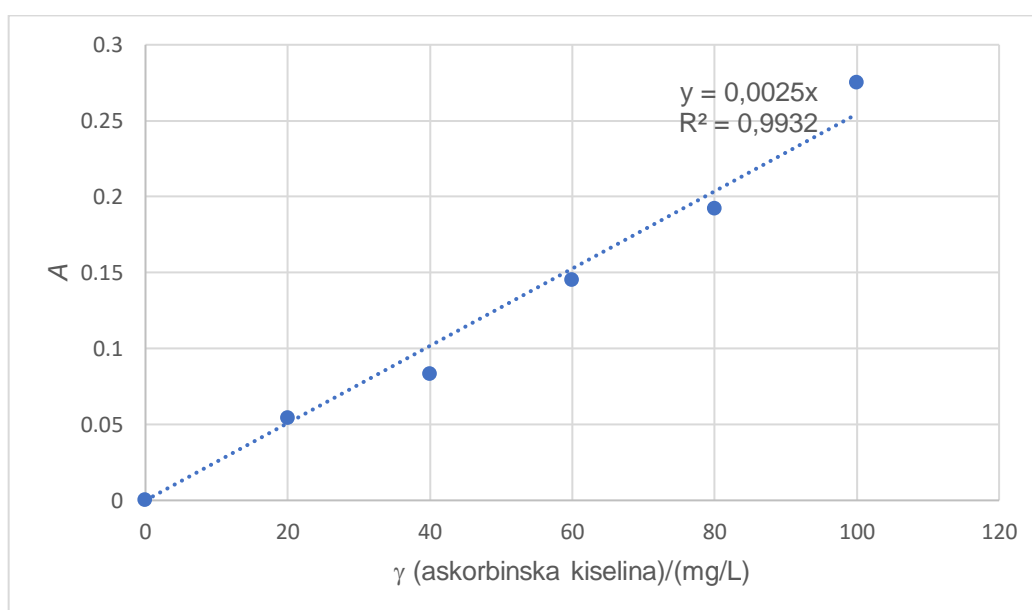
- 1) DPPH reagens (c = 0,094 mM)

0.094 mM DPPH reagens priprema se na način da se odvaži 0,0019 g DPPH u lađicu za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te

nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom i čuva u zatvorenoj tikvici na tamnom mjestu.

#### 3.2.4.2.2. Izrada baždarnog dijagrama askorbinske kiseline

Od otopine standarda askorbinske kiseline ( $\gamma = 100 \text{ mg/L}$ ) pripreme se razrjeđenja standardnih otopina askorbinske kiseline masenih koncentracija 20, 40, 60, 80 i 100 mg/L na način da se redom otpipetira 2, 4, 6, 8 i 10 mL alikvot otopine askorbinske kiseline u odmjerne tikvice od 10 mL te se do oznake nadopune destiliranom vodom. Od svakog razrjeđenja uzme se po 100  $\mu\text{L}$  otopine i 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži isti volumen 100 %-tnog metanola. Pripremljeni uzorci ostave se 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm te se iz dobivenih vrijednosti apsorbancije radi baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije askorbinske kiseline na apscisi i vrijednostima izračunatim kao razlika slijepe probe i apsorbancije na ordinati (slika 12). Iz jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost izražena kao ekvivalent askorbinske kiseline (mg AAE/100 g suhe biljke).



**Slika 12.** Baždarni dijagram askorbinske kiseline za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

#### 3.2.4.2.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka jednak je postupku koji se koristi u izradi baždarnog dijagrama, razlika je jedino u tome što se umjesto standarda askorbinske kiseline koristi razrijeđeni uzorak eteričnog ulja i hidrolata pojedine biljke, a za slijepu probu metanol.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

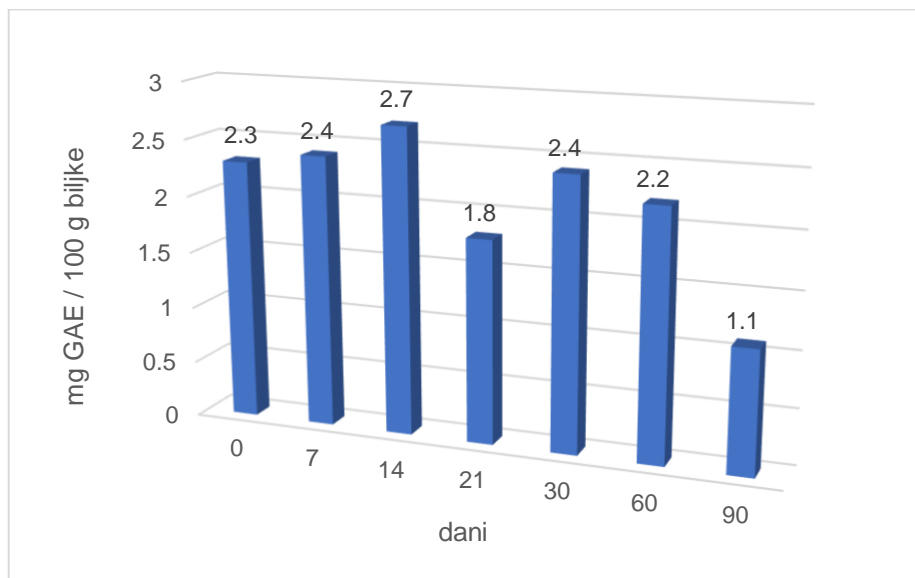
Nakon provedene izolacije eteričnih ulja ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača odvojena su eterična ulja i hidrolati. Uzorci eteričnih ulja navedenih biljaka čuvani su u smeđim staklenim bočicama, a hidrolati u staklenim bočicama pri sobnoj temperaturi u mraku. Tijekom vremenskog perioda od 90 dana, nakon određenog broja dana čuvanja (0., 7., 14., 21., 30., 60. i 90. dan) određeni su spektrofotometrijski maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatu i antioksidacijska aktivnost (FRAP i DPPH metodom) u eteričnim uljima i hidrolatima. Tijekom istraživanja kemijske analize eteričnih ulja i hidrolata ružmarina, lovora, bosilja, kadulje i komorača cilj je bio utvrditi mijenja li se maseni udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja i hidrolata kroz period čuvanja od 90 dana, skladištenjem pri sobnoj temperaturi u mraku.

Rezultati su prikazani redom za svaku biljku (ružmarin, lovor, bosiljak, kadulja, komorač), spektrofotometrijskom metodom su određeni: maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatu, antioksidacijska aktivnost FRAP metodom i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom u hidrolatu i eteričnom ulju kroz period čuvanja od 90 dana, nakon 0., 7., 14., 21., 30., 60. i 90. dana čuvanja pri sobnoj temperaturi u mraku. Dobiveni rezultati masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima pojedine biljke izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na 100 g suhe biljke, a vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom za eterično ulje i hidrolat pojedine biljke izraženi su kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline (AAE) na 100 g suhe biljke.

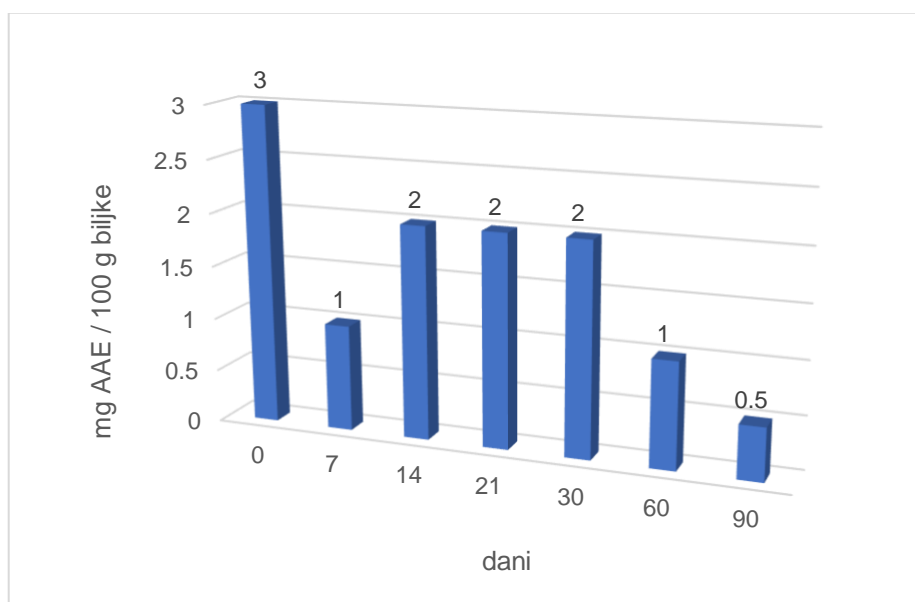
## 4.1. RUŽMARIN

U hidrolatu ružmarina su određeni ukupni fenolni spojevi i rezultati su prikazani grafički na slici 13, a rezultati određene antioksidacijske aktivnosti na slikama 14 i 15.

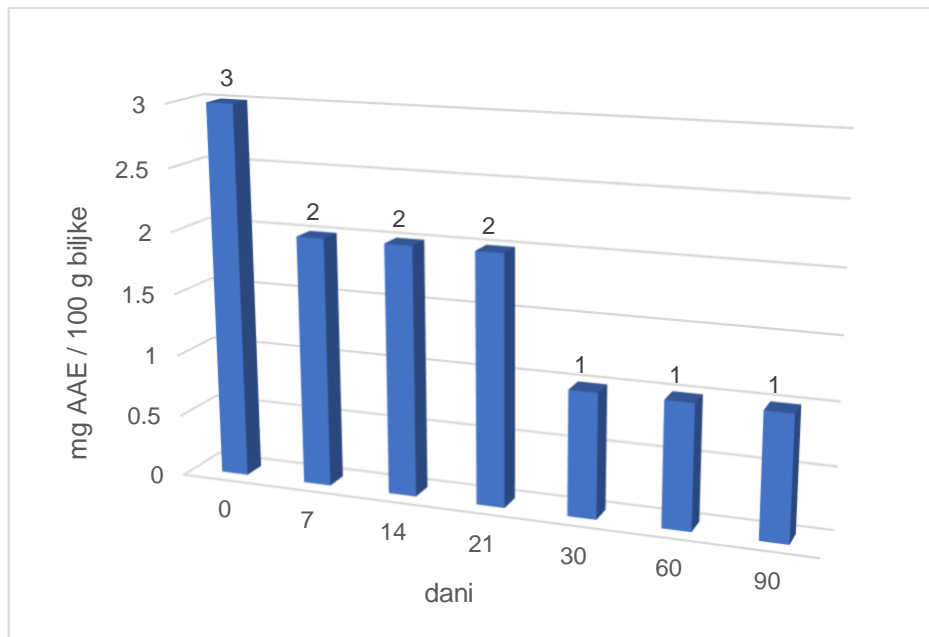
### 4.1.1. Hidrolat ružmarina



**Slika 13.** Grafički prikaz rezultata masenog udjela ukupnih fenola (mg GAE/100 g suhe biljke) u hidrolatu ružmarina u vremenskom periodu od 90 dana.



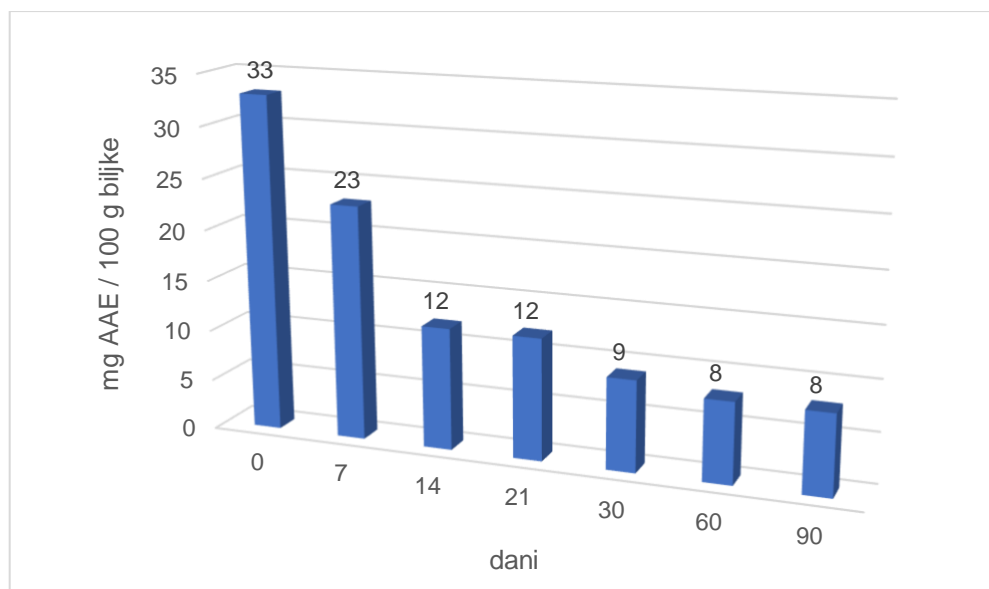
**Slika 14.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u hidrolatu ružmarina u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 15.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u hidrolatu ružmarina u vremenskom periodu od 90 dana.

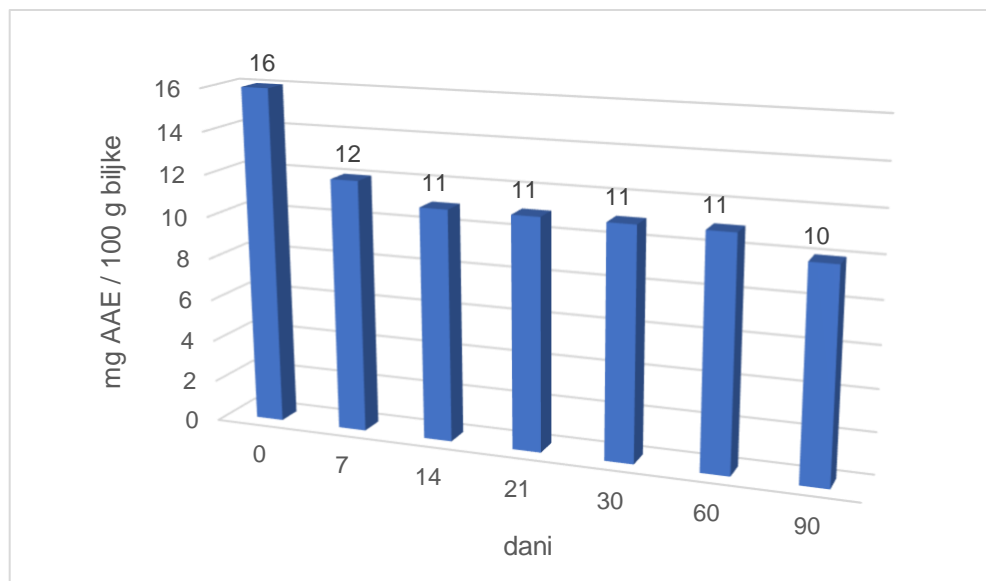
#### 4.1.2. Eterično ulje ružmarina

U eteričnom ulju ružmarina određena je antioksidacijska aktivnost, a rezultati su prikazani na slikama 16 i 17.



**Slika 16.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u eteričnom ulju ružmarina u vremenskom periodu od 90 dana.





**Slika 17.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u eteričnom ulju ružmarina u vremenskom periodu od 90 dana.

U hidrolatu ružmarina su određeni ukupni fenolni spojevi od 2,7 do 1,1 mg GAE/100 g suhe biljke kroz vremenski period od 90 dana, nakon 0., 7., 14., 21., 28., 60. i 90. dana (slika 13). 0. dan maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatu ružmarina iznosi 2,3 mg GAE/100 g suhe biljke, 14. dan je određen maksimum od 2,7 mg GAE/100 g suhe biljke te 90. dan je određen najmanji maseni udio ukupnih fenolnih spojeva od 1,1 mg GAE/100 g suhe biljke. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti hidrolata ružmarina određene FRAP metodom smanjuje se od 3 mg AAE/100 g suhe biljke (0. dan) do 0,5 mg AAE/100 g suhe biljke (90. dan) u vremenskom intervalu od 90 dana. Iz dijagrama (slika 14) se vidi da vrijednost antioksidacijske aktivnosti hidrolata ružmarina određenog FRAP metodom opada nakon 14 dana čuvanja na 2 mg GAE/100 g suhe biljke, odnosno nakon 60 dana na 1 mg GAE/100 g suhe biljke. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti hidrolata ružmarina određene DPPH metodom smanjuju se od 3 mg AAE/100 g suhe biljke do 1 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama (slika 15) se vidi da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom opadaju nakon 30 dana čuvanja. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene FRAP metodom smanjuju se od 33 mg AAE/100 g suhe biljke do 8 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama (slika 16) se vidi da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene FRAP metodom znatno opada nakon 7 dana čuvanja. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene DPPH metodom smanjuju se od 16 mg AAE/100 g suhe biljke do 10 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90

dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama (slika 17) se vidi da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene DPPH metodom smanjuju nakon 14 dana te daljnjim čuvanjem do 90 dana imaju stalnu vrijednost od 11 mg AAE/100 g suhe biljke. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom u hidrolatu ružmarina imaju vrlo slične vrijednosti i postepen pad antioksidacijske aktivnosti. Rezultati antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene FRAP metodom 0. dan analize duplo su veće (33 mg AAE/100 g suhe biljke) od onih određenih DPPH metodom (16 mg AAE/100 g suhe biljke), dok nakon 14 dana analize dobivene vrijednosti ove dvije metode vrlo su slične. Za detaljniju usporedbu trebala bi se provesti barem još jedna dodatna metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti kako bi lakše usporedili dobivene rezultate te utvrđivanje koja metoda pokazuje točnije vrijednosti antioksidacijske aktivnosti.

Lahmar i sur. (2023) odredili su maseni udio ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom i dobili vrijednost od 55,76  $\mu\text{g}$  GAE/ mL hidrolata. Wojdylo i sur. (2007) odredili su maseni udio ukupnih fenola čija vrijednost iznosi 1,71 mg GAE/100 g suhe biljke iz čega možemo zaključiti da su dobivene vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu ružmarina dobivene za 0. dan usporedive s drugim autorima. Zbog manjka literaturnih podataka masenog udjela fenolnih spojeva kroz vremenski period, vrijednosti su uspoređene s 0. dan mjerenja. Dobiveni rezultati pokazuju pad masenog udjela fenolnih spojeva kroz period od 90 dana. U literaturnim podacima o antioksidacijskoj aktivnosti eteričnog ulja i hidrolata ružmarina su prikazani rezultati u drugim ekvivalentnim mjernim jedinicama ovih rezultata i sve spomenute vrijednosti su uspoređene s 0. danom mjerenja. Hiregoudar i sur. (2023) odredili su antioksidacijsku aktivnost eteričnog ulja ružmarina. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom iznose  $\text{IC}_{50} = 48,17 \pm 0,16 \%$ , a za FRAP metodu  $\text{IC}_{50} = 49,19 \pm 0,16 \%$ . Prema Zaouali i sur. (2010) vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene DPPH metodom iznose  $\text{IC}_{50} = 26,5 \pm 1,1 \mu\text{L/mL}$  ekstrakta, a vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom 17,76 mmol/L ekstrakta. Pregledom literature, sličnu metodu određivanja vrijednosti antioksidacijske aktivnosti koristili su Christaki i sur. (2022). Razlika je u tome što se rezultati u ovom radu referiraju na askorbinsku kiselinu (AAE) za određivanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, dok u prethodno spomenutom radu prema ekvivalentu Troloxa (TE). Vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u radu iz 2022. godine iznosi  $32,21 \pm 0,70 \text{ mg TE/g}$  ekstrakta, a vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena DPPH metodom  $47,87 \pm 0,70 \text{ mg TE/g}$  ekstrakta. Vrijednost antioksidacijske aktivnosti hidrolata ružmarina u literaturnim podacima nije nađena za FRAP metodu dok vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena DPPH metodom prema Gaspar-Pintilieș i sur. (2022) iznosi  $11,80 \pm 0.59 \mu\text{M TE/g}$

suhe biljke. Dakle, može se zaključiti da hidrolat i eterično ulje ružmarina posjeduje snažnu antioksidacijsku aktivnost što je potvrđeno i dobivenim rezultatima.

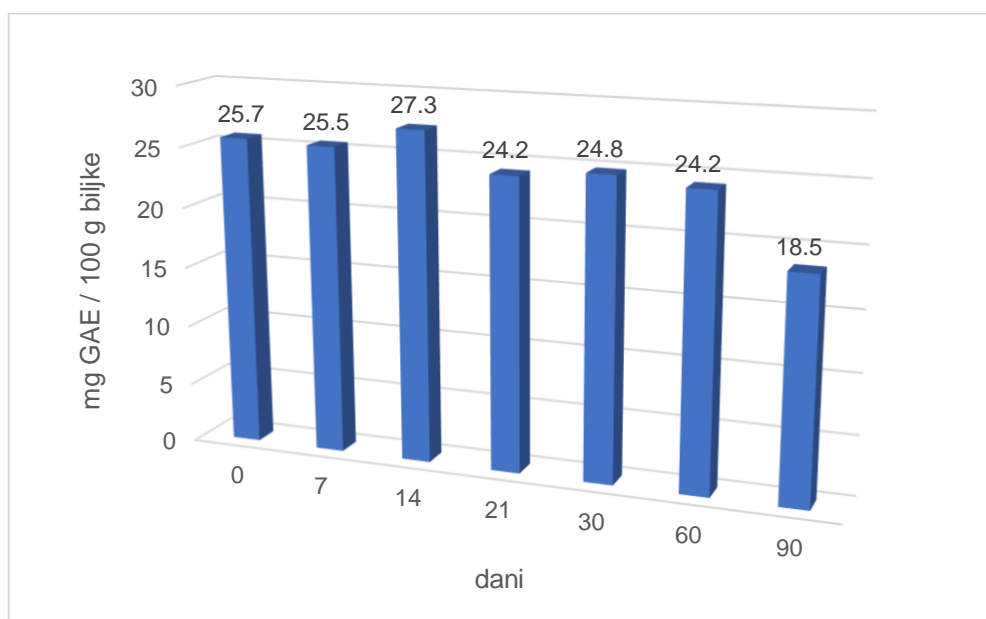
Iz prikazanih rezultata određenog masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu ružmarina, s vremenom čuvanja hidrolata maseni udio fenolnih spojeva se smanjuje naročito nakon 60. dana čuvanja (od 2.3 do 1,1 mg GAE/100 g suhe biljke).

Iz prikazanih rezultata određene antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom u hidrolatu ružmarina, s vremenom čuvanja hidrolata antioksidacijska aktivnost se smanjuje naročito nakon 30. dana čuvanja (od 3 do 1 mg AAE/100 g suhe biljke). U eteričnom ulju ružmarina također dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom. FRAP metodom određena antioksidacijska aktivnost se smanjuje već 7. dan (od 33 do 23 mg AAE/100 g suhe biljke), nakon 14. dana pada na 12 i do 90. dana lagano pada (od 12 do 11 mg AAE/100 g suhe biljke). DPPH metodom određena antioksidacijska aktivnost se smanjuje već 7. dan (od 16 do 12 mg AAE/100 g suhe biljke) i daljnjim čuvanjem se značajnije ne mijenja.

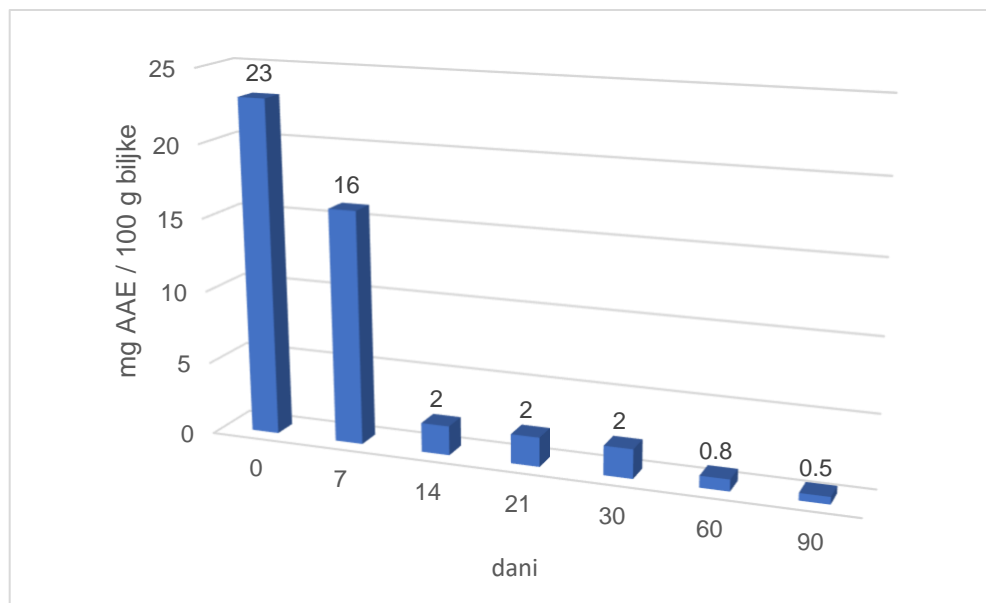
## 4.2. LOVOR

### 4.2.1. Hidrolat lovora

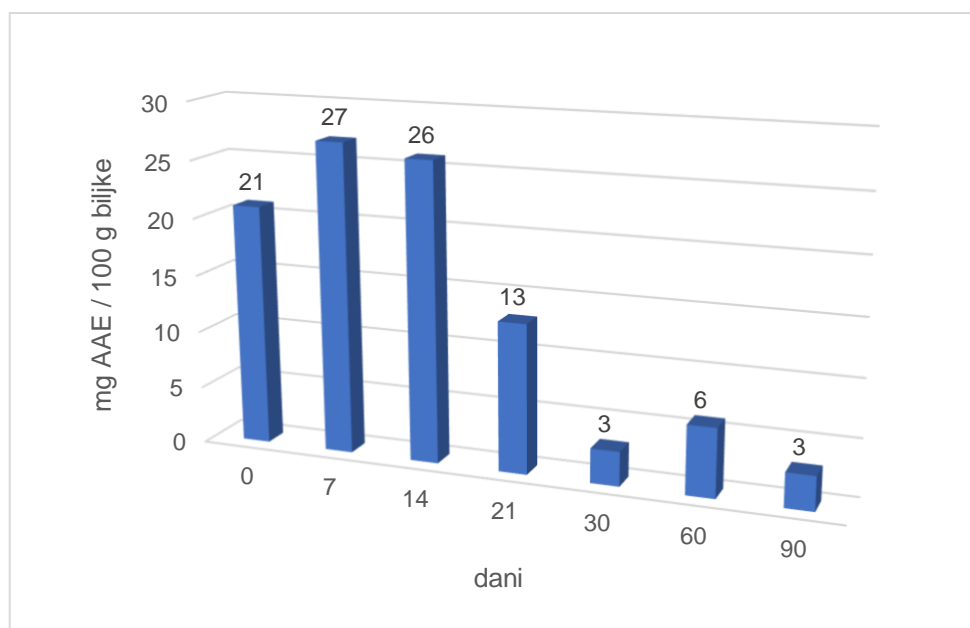
U hidrolatu lovora su određeni ukupni fenolni spojevi i rezultati su prikazani grafički na slici 18, a rezultati određene antioksidacijske aktivnosti na slikama 19 i 20.



**Slika 18.** Grafički prikaz rezultata masenog udjela ukupnih fenola (mg GAE/100 g suhe biljke) u hidrolatu lovora u vremenskom periodu od 90 dana.



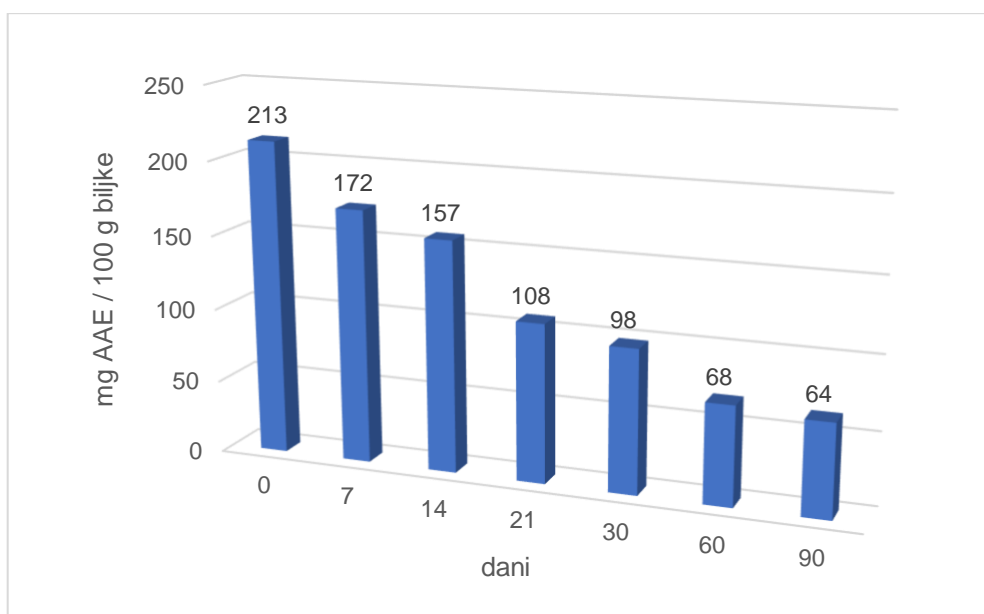
**Slika 19.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u hidrolatu lovora u vremenskom periodu od 90 dana.



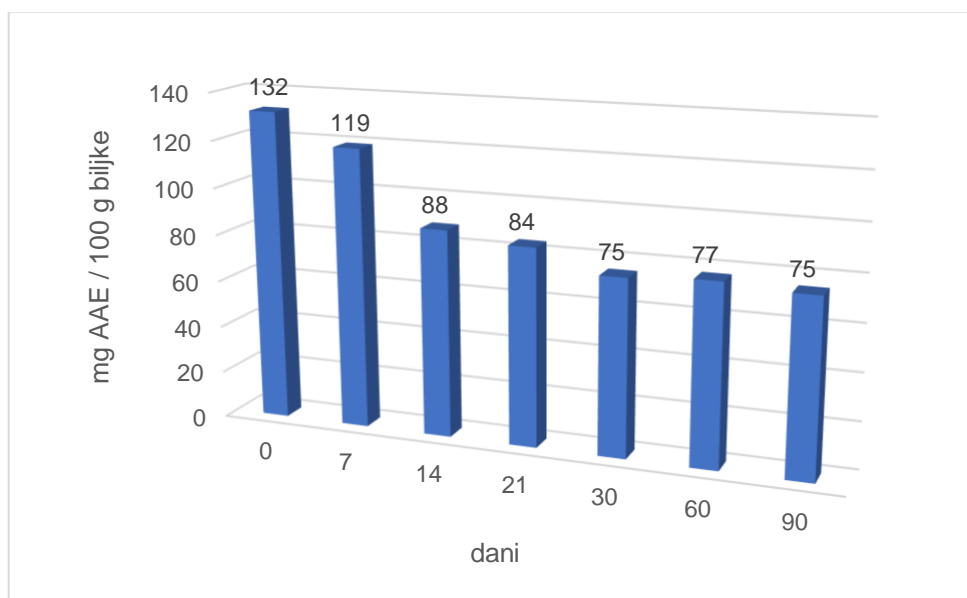
**Slika 20.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u hidrolatu lovora u vremenskom periodu od 90 dana.

#### 4.2.2. Eterično ulje lovora

U eteričnom ulju lovora određena je antioksidacijska aktivnost, a rezultati su prikazani na slikama 21 i 22.



**Slika 21.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u eteričnom ulju lovora u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 22.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u eteričnom ulju lovora u vremenskom periodu od 90 dana.

U hidrolatu lovora su određeni ukupni fenolni spojevi od 27,3 do 18,5 mg GAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, mjerenjem nakon 0., 7., 14., 21., 30., 60. i 90. dana. Iz dijagrama (slika 18) se vidi da maseni udio ukupnih fenola u hidrolatu lovora blago pada nakon 60. dana, a najmanja određena vrijednost je 18,5 mg GAE/100 g suhe biljke nakon 90. dana čuvanja. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora određene FRAP metodom smanjuju se od 23 mg AAE/100 g suhe biljke do 0,5 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom intervalu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene 0. i 90. dan čuvanja. Nagli pad antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora određene FRAP metodom vidljiv je nakon 14 dana analize, dolazi do smanjenja od 23 do 2 mg AAE/100 g suhe biljke (slika 19). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora određene DPPH metodom smanjuju se od maksimalne 27 mg AAE/100 g suhe biljke do 3 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, gdje je maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora izmjerena 7. dan čuvanja. Pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu lovora izmjerene DPPH metodom vidljiv je nakon 21. dana, dolazi do smanjenja od 21 do 13 mg AAE/100 g suhe biljke (slika 20). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja lovora određene FRAP metodom smanjuju se od 213 mg AAE/100 g suhe biljke do 64 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama se vidi da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja ružmarina određene FRAP metodom postepeno opadaju, a najveći pad zabilježen je nakon 21 dana čuvanja, kada dolazi do smanjenja od 213 do 108 mg AAE/100 g suhe biljke (slika 21). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja lovora određene DPPH metodom smanjuju se od 132 mg AAE/100 g biljke do 75 mg AAE/100 g biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama (slika 22) vidi se da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja lovora određene DPPH metodom blago opadaju nakon 14 dana čuvanja. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom za hidrolat lovora blago se razlikuju, ali u obje je vidljiv pad antioksidacijske aktivnosti. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom eteričnog ulja lovora prate istu crtu trenda s razlikama u početnim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti gdje je vrijednost antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP metodom za 60 % veća nego vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerena DPPH metodom. Za bolju validaciju rezultata trebala bi se uvesti dodatna metoda kako bi se bolje moglo usporediti dobivene vrijednosti ovih dvaju metoda i procijeniti koja metoda je točnija.

Prema literaturnim podacima maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatu lovora iznosi 2,272 mg GAE/g biljke prema Maleš i sur. (2022) što je veća vrijednost u usporedbi sa dobivenim u ovom radu koji iznosi 25,7 mg GAE/100 g suhe biljke što može biti razlog sam postupak destilacije ali i priroda samog biljnog materijala kao i geografsko podrijetlo.

Vrijednosti masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva uspoređene su 0. dan mjerenja obzirom da nema navedene literature kroz vremenski period. Vrijednost antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju lovora prema Chrysargyris i sur. (2020) za DPPH metodu iznosi  $32,51 \pm 5,53$  mg TE/g biljke, dok za FRAP metodu iznosi  $15,59 \pm 1,22$  mg TE/g biljke. Nisu nađeni znanstveni radovi koji su ekvivalentni usporedbi s dobivenim podacima obzirom na različiti način izražavanja mjernih jedinica, također nema dostupnih podataka o vrijednostima antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom kroz određeni vremenski period te vrijednosti antioksidacijske vrijednosti određene FRAP i DPPH metodom za hidrolat lovora. Međutim, u literaturnim navodima je dokazana antioksidacijska aktivnost hidrolata i eteričnog ulja lovora što je potvrđeno dobivenim rezultatima provedenih analiza prikazanih u ovom radu. Podaci dobiveni u ovom radu pokazuju pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kroz vremenski period od 90 dana i za hidrolat i eterično ulje lovora.

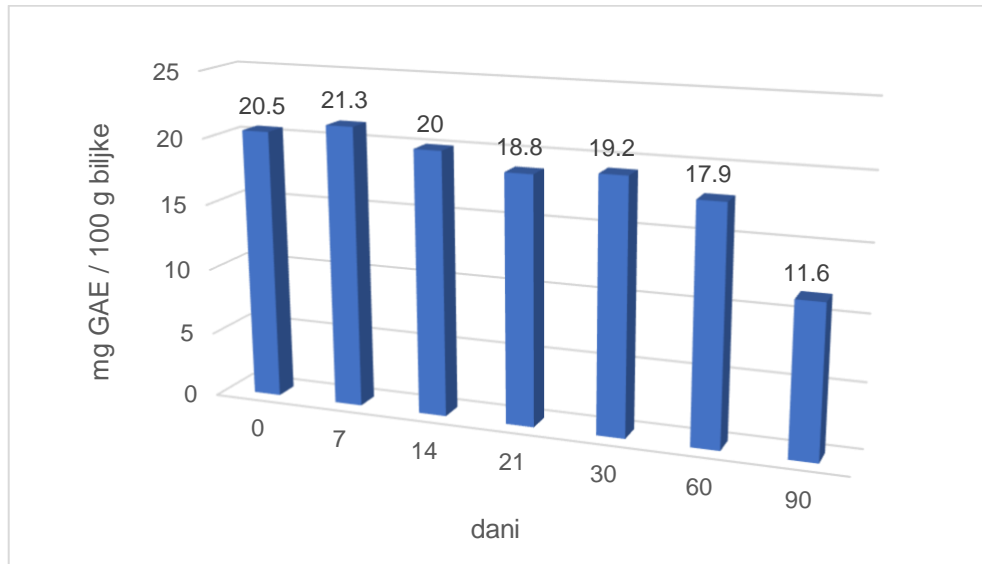
Iz prikazanih rezultata određenog masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu lovora, s vremenom čuvanja hidrolata maseni udio fenolnih spojeva do 60 dana čuvanja se kreće u rasponu od 27,3 do 24,2 mg GAE/100 g suhe biljke, s nešto većim smanjenjem nakon 90. dana od 18,5 mg GAE/100 g suhe biljke.

Iz prikazanih rezultata određene antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u hidrolatu lovora, s vremenom čuvanja hidrolata antioksidacijska aktivnost se smanjuje naročito nakon 14 dana čuvanja (od 23 do 2 mg AAE/100 g suhe biljke) te nakon 90 dana od 0,5 mg GAE/100 g suhe biljke. DPPH metodom, antioksidacijska aktivnost se smanjuje tek nakon 21 dana od 21 do 13 mg GAE/100 g suhe biljke, s značajnijim padom nakon 90 dana od 3 mg GAE/100 g suhe biljke. U eteričnom ulju lovora također dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom. FRAP metodom određena antioksidacijska aktivnost se postepeno smanjuje, s značajnim padom nakon 21. dana od 213 do 108 mg AAE/100 g suhe biljke, a DPPH metodom od 132 do 75 mg AAE/100 g suhe biljke, s značajnim padom nakon 14. dana od 88 mg AAE/100 g suhe biljke.

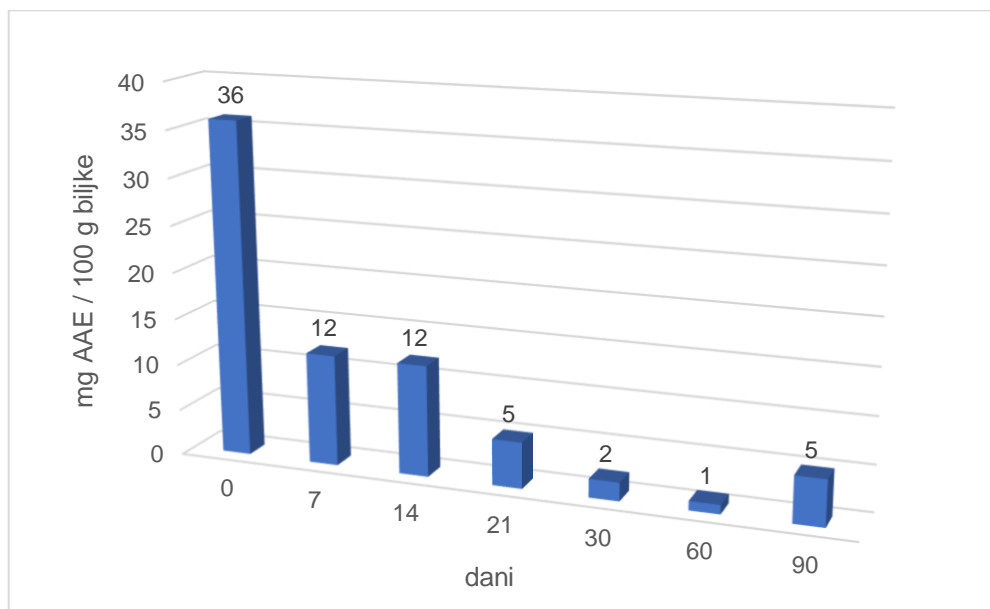
## 4.3. BOSILJAK

### 4.3.1. Hidrolat bosiljka

U hidrolatu bosiljka su određeni ukupni fenolni spojevi i rezultati su prikazani grafički na slici 23, a rezultati određene antioksidacijske aktivnosti na slikama 24 i 25.

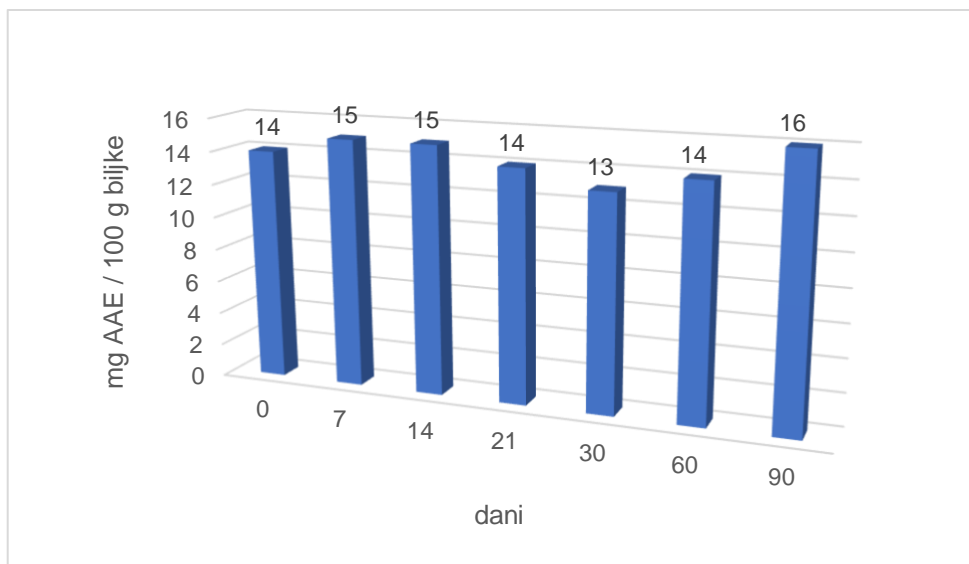


**Slika 23.** Grafički prikaz rezultata masenog udjela fenola (mg GAE/100 g suhe biljke) u hidrolatu bosiljka u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 24.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u hidrolatu bosiljka u vremenskom periodu od 90 dana.

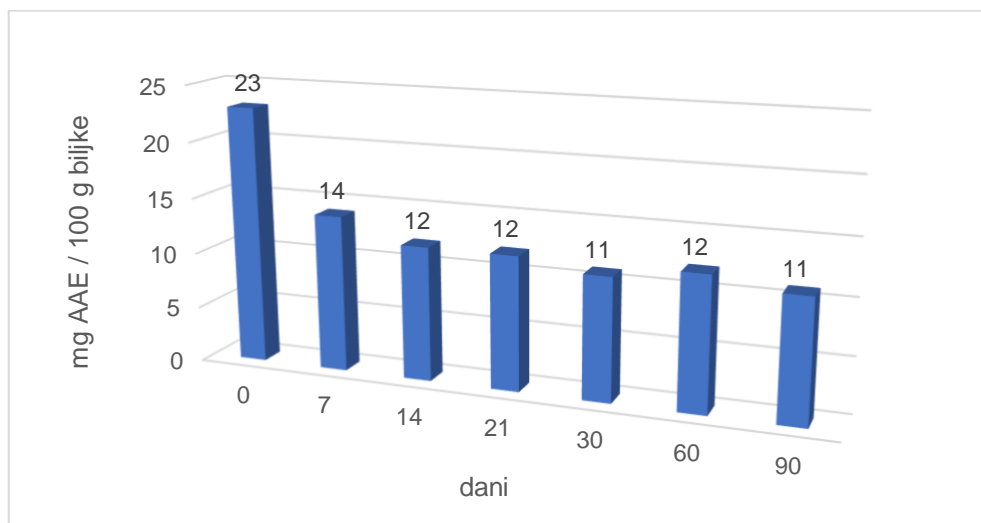




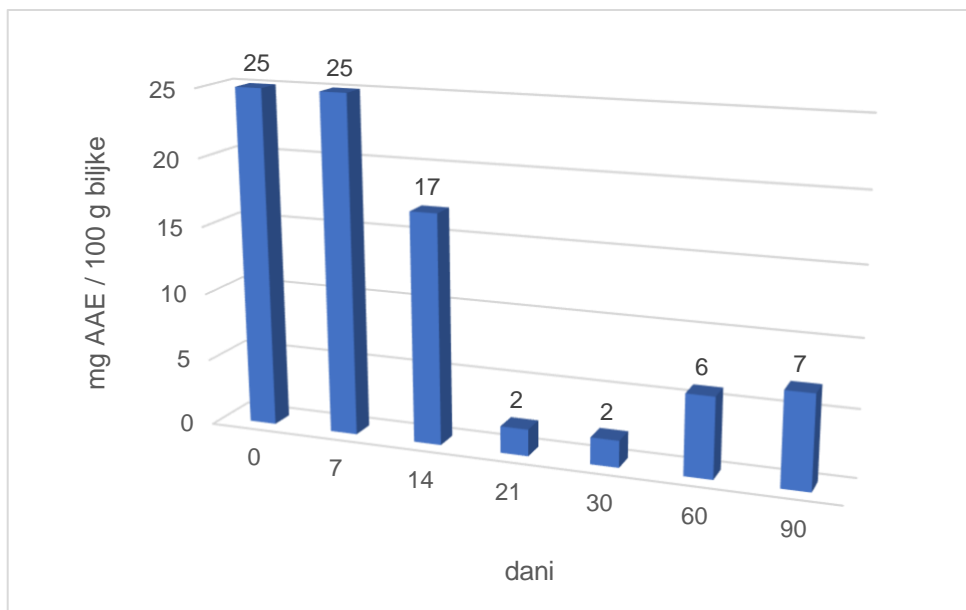
**Slika 25.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u hidrolatu bosiljka u vremenskom periodu od 90 dana.

#### 4.3.2. Eterično ulje bosiljka

U eteričnom ulju bosiljka određena je antioksidacijska aktivnost, a rezultati su prikazani na slikama 26 i 27.



**Slika 26.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u eteričnom ulju bosiljka u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 27.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u eteričnom ulju bosiljka u vremenskom periodu od 90 dana.

U hidrolatu bosiljka su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva od 21,3 do 11,6 mg GAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, nakon 0., 7., 14., 21., 28., 60. i 90. dana. Rezultati (slika 23) pokazuju blagi pad masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva nakon 90 dana čuvanja. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka određene FRAP metodom smanjuju se od 36 mg AAE/100 g suhe biljke do 5 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, prilikom čega su prethodno navedene vrijednosti izmjerene 0. i 90. dan čuvanja. Nagli pad antioksidacijske vrijednosti hidrolata bosiljka određene FRAP metodom vidljiv je već nakon 7. dana čuvanja (12 mg AAE/100 g suhe biljke), dok najmanja izmjerena vrijednost od 1 mg AAE/100 g suhe biljke određena je 60. dan (slika 24). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka određene DPPH metodom kreću se od 14 mg AAE/100 g suhe biljke do 16 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, prilikom čega su prethodno navedene vrijednosti izmjerene 0. i 90. dan čuvanja. Rezultati pokazuju (slika 25) konstantne vrijednosti bez pada antioksidacijske aktivnosti. Usporedbom rezultata antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka FRAP i DPPH metodom vidljivo je da se rezultati uvelike razlikuju, stoga je potrebno napraviti dodatno ispitivanje sa još jednom metodom kako bi rezultati bili usporedivi. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja bosiljka određene FRAP metodom smanjuju se od 23 mg AAE/100 g suhe biljke do 11 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Pad antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja bosiljka određene FRAP metodom vidljiv je 7. dan analize (14 mg AAE/100 g suhe biljke) (slika 26).

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja bosiljka određene DPPH metodom smanjuju se od 25 mg AAE/100 g biljke do 7 mg AAE/100 g biljke u vremenskom periodu od 90 dana (slika 27), a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Usporedbom rezultata antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja bosiljka određene FRAP i DPPH metodom vidljiva je sličnost između početne i konačne vrijednosti s najvećom razlikom u vrijednostima 21. i 30. dan analize.

Uyoh i sur. (2013) odredili su maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu bosiljka podrijetlom iz Nigerije čija vrijednost iznosi 27,41 mg GAE/g suhe biljke, što iznosi više nego u hidrolatu bosiljka s obzirom da su u hidrolatu prisutni i drugi spojevi kao npr. hlapljivi spojevi. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju bosiljka odredili su Skrypnik i sur. (2019) DPPH metodom od  $11.59 \pm 0.44$  mg TE/g ekstrakta, te FRAP metodom od  $20.75 \pm 0.93$  mg TE/g ekstrakta. U literaturi nisu pronađeni rezultati drugih autora izraženih u ekvivalentnim mjernim jedinicama obzirom na rezultate dobivene u ovom radu. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka FRAP metodom određivali su Dragičević i sur. (2024) te dobili vrijednost antioksidacijske aktivnosti od  $392 \pm 16.299$  mmol Fe<sup>2+</sup>/L hidrolata. Također, slično istraživanje proveli su Xylia i sur. (2024) koji su ispitivali vrijednost antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka DPPH i FRAP metodom čije vrijednosti analize iznose  $7.92 \pm 1.07$  mg TE/g biljke za DPPH metodu te  $10.75 \pm 1.24$  mg TE/g biljke za FRAP metodu. Iako su rezultati prikazani u drugim ekvivalentnim mjernim jedinicama, vidljivo je da hidrolat i eterično ulje bosiljka posjeduje snažnu antioksidacijsku aktivnost što je potvrđeno provedenim analizama i rezultatima prikazanim u ovom radu.

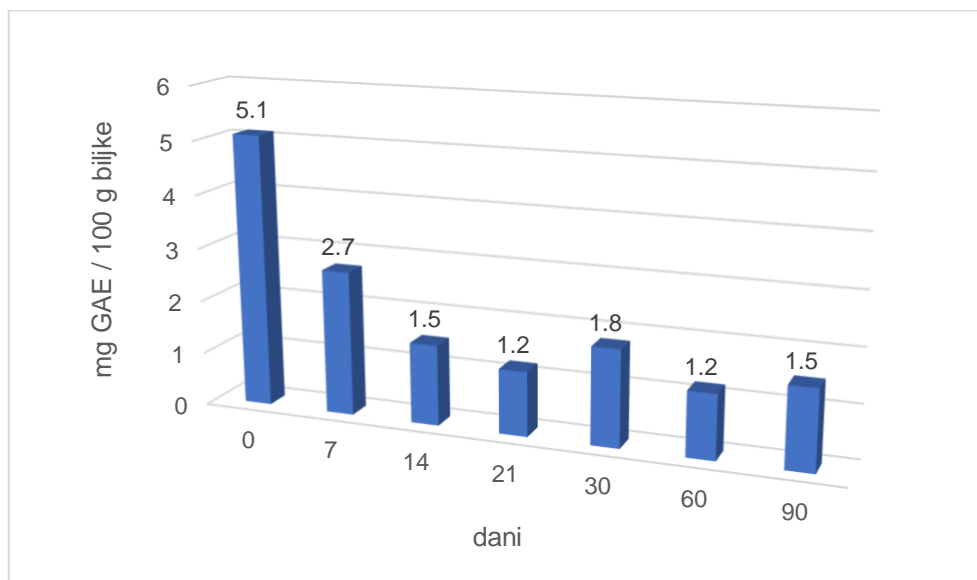
Iz prikazanih rezultata određenog masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu bosiljka, s vremenom čuvanja hidrolata maseni udio fenolnih spojeva do 60. dana čuvanja se kreće u rasponu od 21,3 do 17,9 mg GAE/100 g suhe biljke, s nešto većim smanjenjem nakon 90. dana od 11,3 mg GAE/100 g suhe biljke.

Iz prikazanih rezultata određene antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u hidrolatu bosiljka, s vremenom čuvanja hidrolata antioksidacijska aktivnost se smanjuje naročito nakon 7 dana čuvanja (od 36 do 12 mg AAE/100 g suhe biljke) te nakon 90 dana od 5 mg GAE/100 g suhe biljke. DPPH metodom, antioksidacijska aktivnost se kretala od 16 do 14 mg GAE/100 g suhe biljke te bi svakako trebalo provesti određivanje antioksidacijske aktivnosti još jednom metodom kako bi se sa sigurnošću mogli potvrditi dobiveni rezultati. U eteričnom ulju bosiljka također dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom. FRAP metodom određena antioksidacijska aktivnost se postepeno smanjuje, s značajnim padom nakon 7. dana od 23 do 14 mg AAE/100 g suhe biljke, a DPPH metodom od 25 do 7 mg AAE/100 g suhe biljke, s značajnim padom nakon 21. dana od 2 mg AAE/100 g suhe biljke.

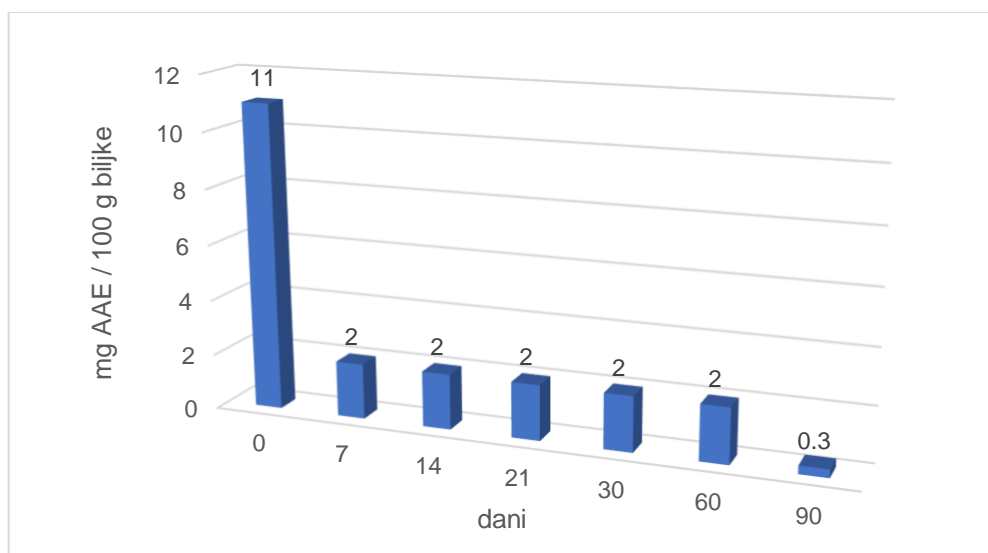
## 4.4. KADULJA

### 4.4.1. Hidrolat kadulje

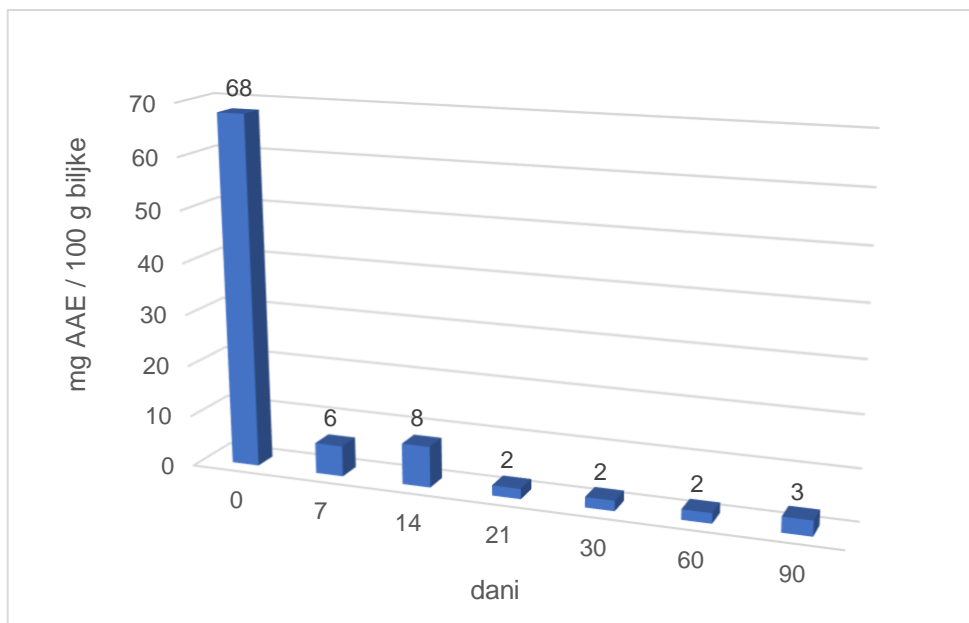
U hidrolatu kadulje su određeni ukupni fenolni spojevi i rezultati su prikazani grafički na slici 28, a rezultati određene antioksidacijske aktivnosti na slikama 29 i 30.



**Slika 28.** Grafički prikaz rezultata masenog udjela ukupnih fenola (mg GAE/100 g suhe biljke) u hidrolatu kadulje u vremenskom periodu od 90 dana.



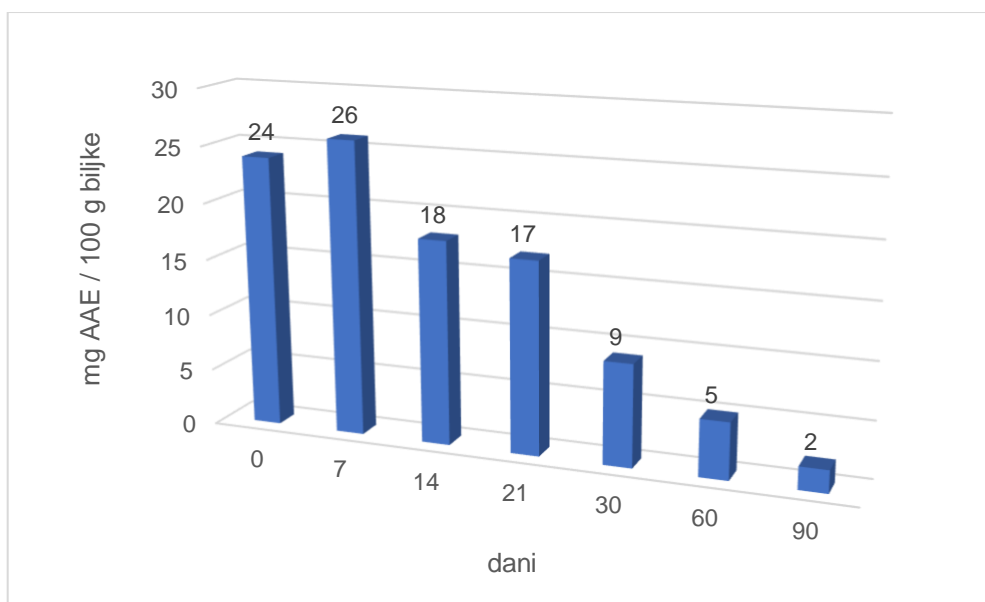
**Slika 29.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u hidrolatu kadulje u vremenskom periodu od 90 dana.



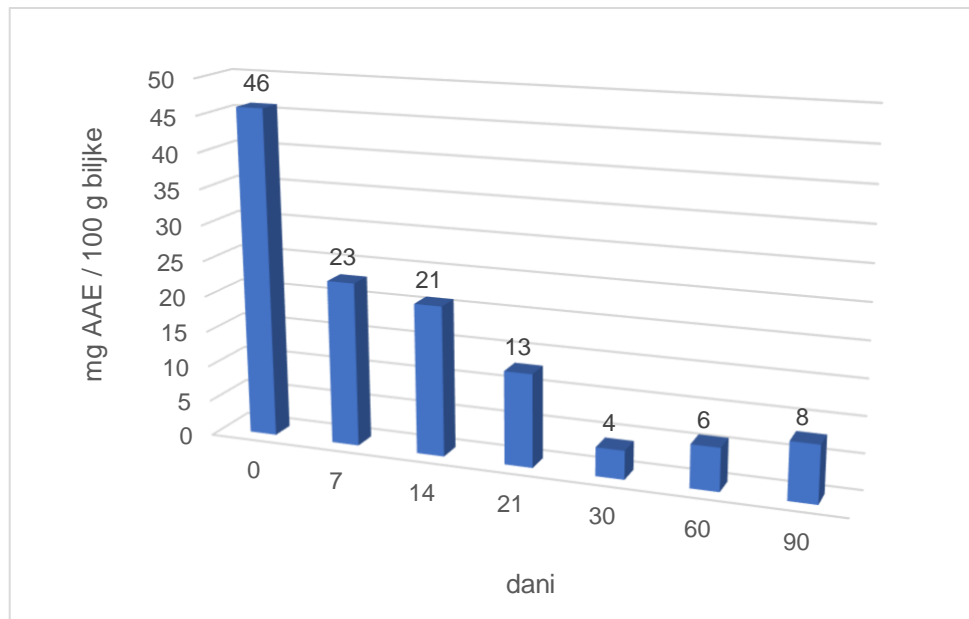
**Slika 30.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u hidrolatu kadulje u vremenskom periodu od 90 dana.

#### 4.4.2. Eterično ulje kadulje

U eteričnom ulju kadulje određena je antioksidacijska aktivnost, a rezultati su prikazani na slikama 31 i 32.



**Slika 31.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u eteričnom ulju kadulje u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 32.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u eteričnom ulju kadulje u vremenskom periodu od 90 dana.

U hidrolatu kadulje su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva od maksimalne vrijednosti 5,1 mg GAE/100 g suhe biljke izmjerene 0. dan do 1,5 mg GAE/100 g suhe biljke izmjerene 90. dan analize. Pad vrijednosti masenog udjela fenolnih spojeva u hidrolatu kadulje vidljiv je 7. dan analize. Vrijednosti antioksidacijske vrijednosti u hidrolatu kadulje izmjerene FRAP metodom smanjuju se od 11 mg AAE/100 g suhe biljke do 0,3 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan. Nagli pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP metodom u hidrolatu kadulje vidljive su 7. dan analize. Vrijednosti antioksidacijske vrijednosti u hidrolatu kadulje izmjerene DPPH metodom smanjuju se od 68 mg AAE/100 g suhe biljke do 3 mg AAE/100 g suhe biljke, a najveći pad vidljiv je 7. dan analize. Usporedbom rezultata FRAP i DPPH analize za određivanje antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu kadulje razlikuju se u početnim vrijednostima gdje je vrijednost antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu kadulje izmjerene DPPH metodom šest puta veća nego vrijednost antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu kadulje izmjerena FRAP metodom. Oba dijagrama pokazuju pad vrijednosti 7. dan analize te slične vrijednosti do 90. dana analize. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja kadulje određene FRAP metodom smanjuju se od 24 mg AAE/100 g suhe biljke do 2 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Pad antioksidacijske vrijednosti u eteričnom ulju kadulje vidljiv je nakon 30 dana čuvanja (9 mg AAE/100 g suhe biljke). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja kadulje određene DPPH metodom smanjuju se od 46 mg AAE/100 g biljke do 8 mg AAE/100 g biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti

izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju kadulje izmjerene DPPH metodom vidljiv je 30. dan analize (4 mg AAE/100 g suhe biljke). Usporedbom rezultata FRAP i DPPH metode za određivanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju kadulje vidljivo je da su slični rezultati, jedina razlika je u vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene 0. dan analize.

Vrijednost masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu kadulje prema Wojdylo i sur. (2007) iznosi 8,25 mg GAE/100 g suhe biljke što je približno dobivenom rezultatu od 5,1 mg GAE/100 g suhe biljke. Prema drugim autorima (Chrisaki i sur., 2022) koji su kao ekvivalent koristili kafeinsku kiselinu (CAE) te se prema njoj izrazili maseni udio fenolnih spojeva u hidrolatu kadulje iznosi  $325,49 \pm 17,05$  mg CAE/100 g suhe biljke. Obzirom da nema literaturnih podataka za vrijednosti masenog udjela fenolnih spojeva kroz vremenski period, rezultati se uspoređuju na temelju 0. dana mjerenja. Također odredili su i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju kadulje DPPH metodom i FRAP metodom. Rezultati DPPH metode pokazuju vrijednost od  $49,61 \pm 0,52$  mg TE/g suhe biljke, a FRAP metode  $30,07 \pm 1,84$  mg TE/g suhe biljke. Vrijednost antioksidacijske aktivnosti hidrolata kadulje određene DPPH metodom prema Gaspar-Pintiliesc i sur. (2022) iznosi  $11,77 \pm 0,63$   $\mu$ M TE/g suhe biljke, dok su Boualam i sur. (2024) dobili vrijednost za DDPH metodu  $IC_{50} = 87,194 \pm 2,72$   $\mu$ g/mL. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti hidrolata kadulje određene FRAP metodom nisu pronađeni u literaturi. Iako prema literaturnim podacima nisu pronađeni rezultati iskazani u mjernim jedinicama u kojim su iskazani u ovome radu gdje se kao standard koristila askorbinska kiselina, može se zaključiti da hidrolat i eterično ulje kadulje posjeduju snažnu antioksidacijsku aktivnost.

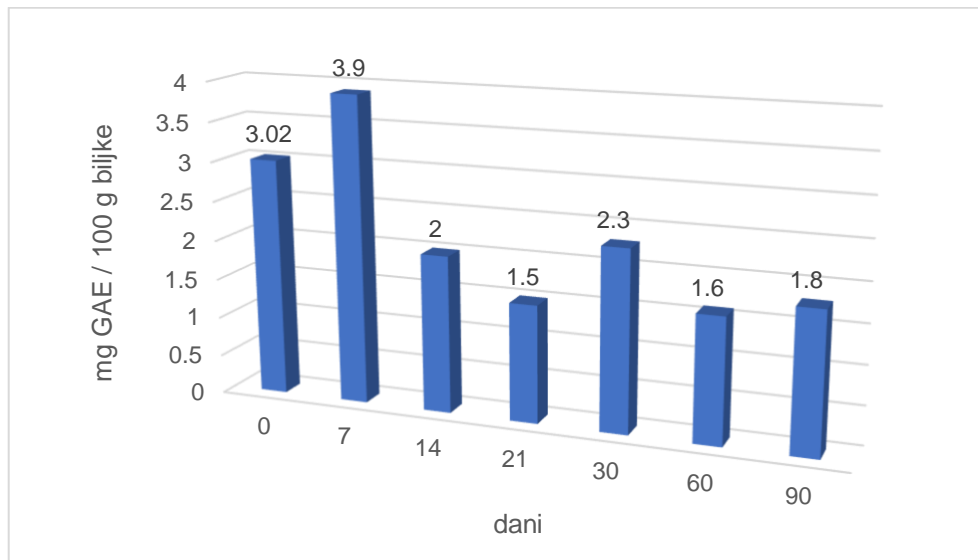
Iz prikazanih rezultata određenog masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu kadulje, s vremenom čuvanja hidrolata maseni udio fenolnih spojeva do 90 dana čuvanja se kreće u rasponu od 5,1 do 1,2 mg GAE/100 g suhe biljke, s nešto većim smanjenjem nakon 60. dana od 1,2 mg GAE/100 g suhe biljke.

Iz prikazanih rezultata određene antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u hidrolatu kadulje, s vremenom čuvanja hidrolata antioksidacijska aktivnost se smanjuje naročito nakon 7. dana čuvanja (od 11 do 2 mg AAE/100 g suhe biljke) te nakon 90. dana od 0,3 mg GAE/100 g suhe biljke. DPPH metodom, antioksidacijska aktivnost se kretala od 68 do 3 mg GAE/100 g, s padom nakon 7. dana (6 mg AAE/100 g suhe biljke). U eteričnom ulju kadulje također dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom. FRAP metodom određena antioksidacijska aktivnost se postepeno smanjuje, s značajnim padom nakon 30. dana od 24 do 9 mg AAE/100 g suhe biljke, a DPPH metodom od 46 do 8 mg AAE/100 g suhe biljke, s značajnim padom nakon 30. dana od 4 mg AAE/100 g suhe biljke.

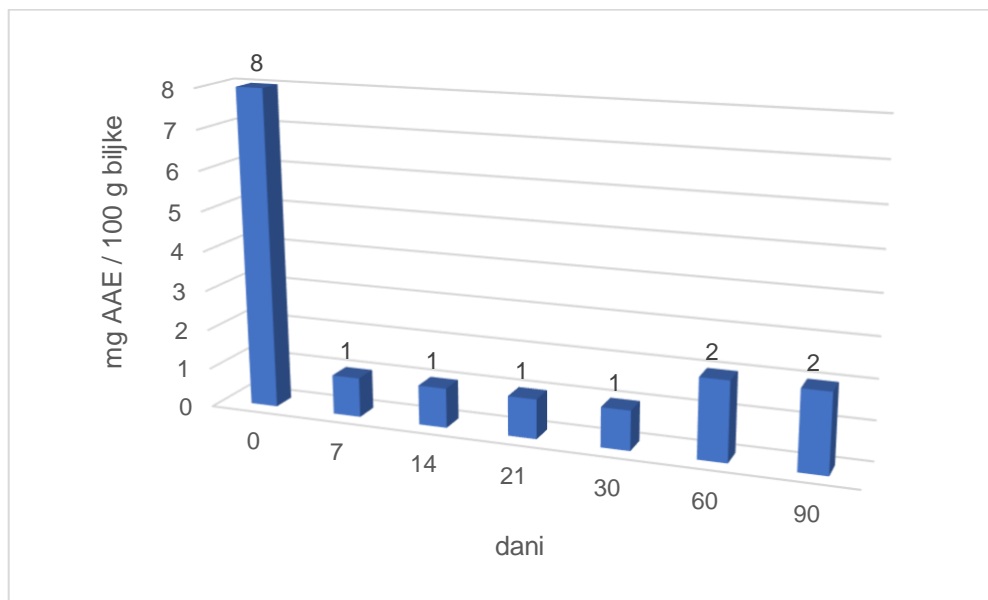
## 4.5. KOMORAČ

### 4.5.1. Hidrolat komorača

U hidrolatu komorača su određeni ukupni fenolni spojevi i rezultati su prikazani grafički na slici 33, a rezultati određene antioksidacijske aktivnosti na slikama 34 i 35.

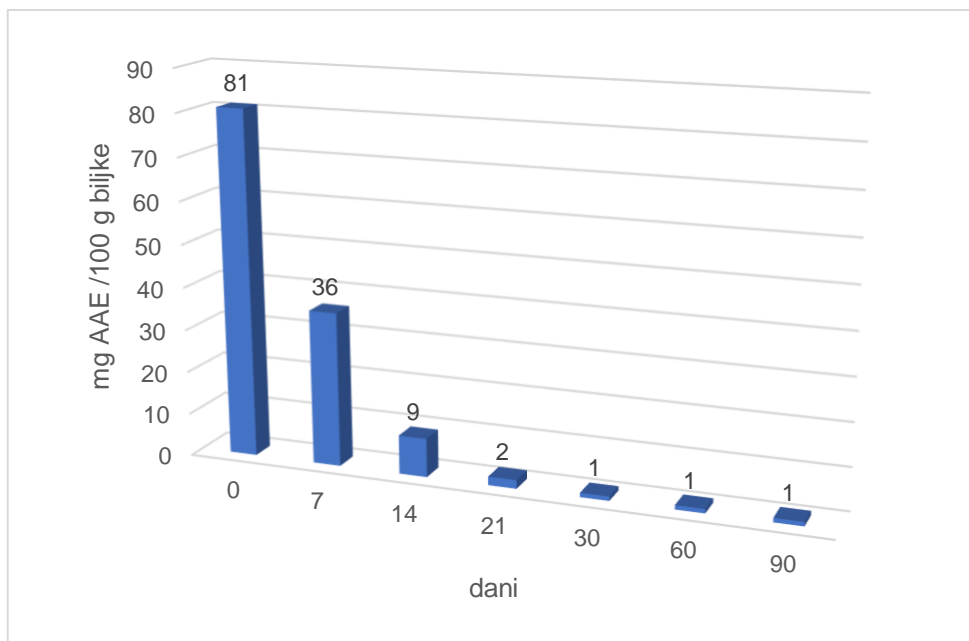


**Slika 33.** Grafički prikaz rezultata masenog udjela ukupnih fenola (mg GAE/100 g suhe biljke) u hidrolatu komorača u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 34.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u hidrolatu komorača u vremenskom periodu od 90 dana.

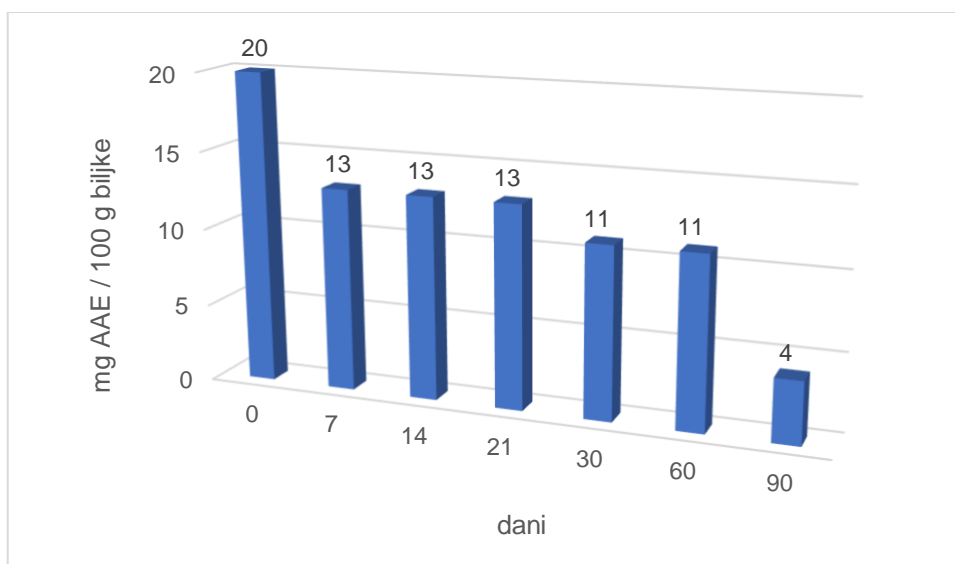




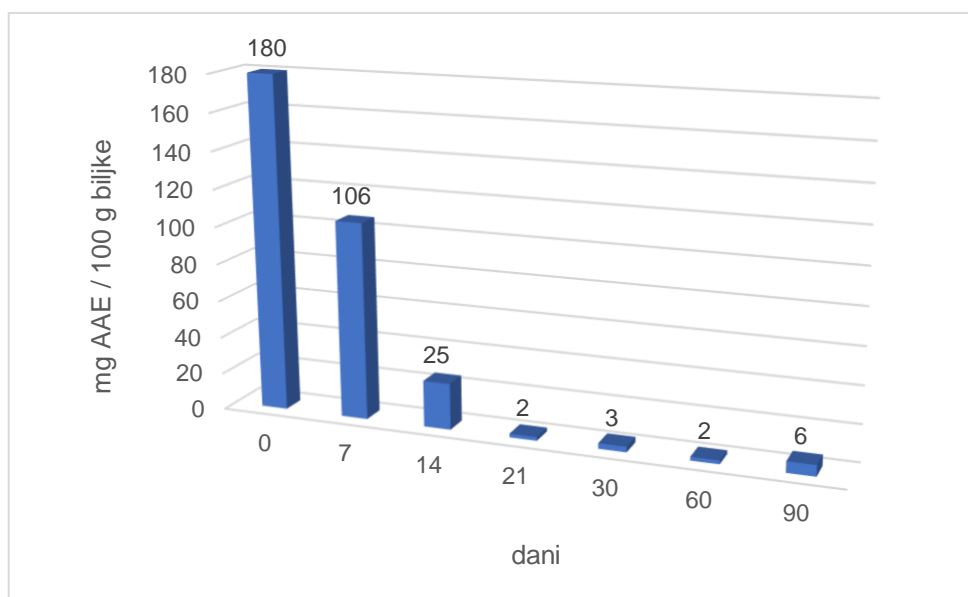
**Slika 35.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u hidrolatu komorača u vremenskom periodu od 90 dana.

#### 4.5.2. Eterično ulje komorača

U eteričnom ulju komorača određena je antioksidacijska aktivnost, a rezultati su prikazani na slikama 36 i 37.



**Slika 36.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) FRAP metodom u eteričnom ulju komorača u vremenskom periodu od 90 dana.



**Slika 37.** Grafički prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti (mg AAE/100 g suhe biljke) DPPH metodom u eteričnom ulju komorača u vremenskom periodu od 90 dana.

U hidrolatu komorača su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva od 3,9 do 1,5 mg GAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana. Blagi pad vrijednosti masenog udjela fenolnih spojeva u hidrolatu komorača vidljiv je 14. dan analize. Vrijednosti antioksidacijske vrijednosti u hidrolatu komorača izmjerene FRAP metodom smanjuju se od 8 mg AAE/100 g suhe biljke do 2 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan. Iz dijagrama je vidljivo da vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu komorača pada već nakon 7 dana. Vrijednosti antioksidacijske vrijednosti u hidrolatu komorača izmjerene DPPH metodom smanjuju se od 81 mg AAE/100 g suhe biljke do 1 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan. Znatni pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti zabilježen je 7. dan analize (36 mg AAE/100 g suhe biljke). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja komorača određene FRAP metodom smanjuju se od 20 mg AAE/100 g suhe biljke do 4 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Iz dijagrama se može očitati pad antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju komorača nakon 60. dana analize. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja komorača određene DPPH metodom smanjuju se od 180 mg AAE/100 g suhe biljke do 6 mg AAE/100 g suhe biljke u vremenskom periodu od 90 dana, a prethodno navedene vrijednosti izmjerene su 0. i 90. dan čuvanja. Znatni pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti zabilježen je 21. dan analize (2 mg

AAE/100 g suhe biljke). Usporedbom rezultata vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju komorača određene FRAP i DPPH metodom vidljiva je velika razlika u dobivenim vrijednostima gdje je početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja komorača određenog DPPH metodom deset puta veća od one određene FRAP metodom. Obzirom da se rezultati razlikuju potrebno je napraviti treću referentnu metodu kako bi vidjeli koji rezultati su relevantniji.

Početna vrijednost masenog udjela fenolnih spojeva u hidrolatu komorača koja iznosi 3,02 mg GAE/100 g biljke te se u velikoj mjeri ne razlikuje u usporedbi s drugim autorima. Bano i sur. (2016) odredili su ukupni maseni udio fenolnih spojeva u hidrolatu komorača od  $3,48 \pm 4,2$  mg GAE/100 g suhe biljke, a Roby i sur. (2013) su dobili sličnu vrijednost koja iznosi  $3,0 \pm 2,6$  mg GAE/100 g biljke. Prethodno navedene vrijednosti uspoređene su 0. dan mjerenja obzirom da nema dostupnih literaturnih podataka za maseni udio fenolnih spojeva hidrolata komorača kroz vremenski period. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja komorača određene DPPH i FRAP metodom objavljene su u radu Sharopov i sur. (2017). Za DPPH metodu vrijednost iznosi  $IC_{50} = 15,6 \pm 1,1$  g/L, a za FRAP metodu  $194 \pm 18$   $\mu$ M  $Fe^{2+}$ /mg ekstrakta. Prema drugim autorima, vrijednost antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulju komorača određene FRAP metodom iznosi  $1,11 \pm 0,08$   $\mu$ M  $Fe^{2+}$ /L, DPPH metodom  $2,00 \pm 0,17$  % inhibicije. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu komorača određene FRAP metodom iznosi  $1,16 \pm 0,15$   $\mu$ M  $Fe^{2+}$ /L, DPPH metodom  $2,17 \pm 0,13$  % inhibicije. U literaturi nisu pronađene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom usporedive s dobivenim vrijednostima eteričnog ulja i hidrolata komorača određene u ovom rada zbog različitih izražavanja mjernih jedinica, ali prikazom dobivenih rezultata dokazana je antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja i hidrolata komorača.

Iz prikazanih rezultata određenog masenog udjela ukupnih fenola u hidrolatu komorača, s vremenom čuvanja hidrolata maseni udio fenolnih spojeva do 90 dana čuvanja se kreće u rasponu od 3,9 do 1,5 mg GAE/100 g suhe biljke, s nešto većim smanjenjem nakon 21. dana od 1,5 mg GAE/100 g suhe biljke.

Iz prikazanih rezultata određene antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u hidrolatu komorača, s vremenom čuvanja hidrolata antioksidacijska aktivnost se smanjuje naročito nakon 7 dana čuvanja (od 8 do 1 mg AAE/100 g suhe biljke) te nakon 60 i 90 dana od 2 mg GAE/100 g suhe biljke. DPPH metodom, antioksidacijska aktivnost se kretala od 81 do 1 mg GAE/100 g, s padom nakon 7 dana (36 mg AAE/100 g suhe biljke) i nakon 21 dana (1 mg AAE/100 g suhe biljke). U eteričnom ulju komorača također dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodom. FRAP metodom određena antioksidacijska aktivnost se postepeno smanjuje, s značajnim padom nakon 30 dana od 20 do 11 mg AAE/100

g suhe biljke. DPPH metodom određena antioksidacijska aktivnost se kretala od 180 do 2 mg GAE/100 g, s padom nakon 7 dana (106 mg AAE/100 g suhe biljke) i nakon 14 dana (24 mg AAE/100 g suhe biljke).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Hidrolati ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača sadrže fenolne spojeve koji su određeni Folin-Ciocalteu metodom.
2. Vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva u hidrolatu ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača smanjuje se kroz vremenski period od 90 dana, do značajnijeg pada dolazi nakon 21. dana čuvanja dok kod kadulje je pad zabilježen već 7. dan.
3. Hidrolat i eterično ulje ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača ima antioksidacijsku aktivnost koja je potvrđena FRAP i DPPH metodom.
4. Eterično ulje ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača pokazuje veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od njihovih hidrolata.
5. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača smanjuju se kroz vremenski period od 90 dana, već nakon 7 dana čuvanja dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, a veći pad vidljiv je nakon 21 dana.
6. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u eteričnom ulja ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača smanjuje se kroz vremenski period od 90 dana, već nakon 7 dana čuvanja dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, a veći pad vidljiv je nakon 21 dana kod bosiljka i nakon 30 dana kod kadulje.
7. S obzirom da se rezultati antioksidacijske aktivnosti metodama DPPH i FRAP ne podudaraju kod svih dobiveni rezultata određene antioksidacijske aktivnosti hidrolata i etričnih ulja analiziranih u ovom radu, za detaljniju procjenu rezultata određene antioksidacijske aktivnosti hidrolata i eteričnih ulja ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača treba provesti barem još jedan test određivanja antioksidacijske aktivnosti.
8. Za daljnju upotrebu eteričnih ulja i hidrolata ružmarina, lovora, bosiljka, kadulje i komorača važno je pravilno čuvanje u prikladnoj ambalaži, dobro zatvoreno i pri odgovarajućoj temperaturi.

## 6. LITERATURA

Aćimović MG, Tešević VV, Smiljanić KT, Cvetković MT, Stanković JM, Kiprovski BM, Sikora VS (2020) Hydrolates – BY-Products of Essential Oil Distillation: Chemical Composition, Biological Activity and Potential Uses. *Adv techn* **9**, 54-70. <https://doi.org/10.5937/savteh2002054A>

Adriana M. Ojeda-Sana, Catalina M. van Baren, Miguel A. Elechosa, Miguel A. Juárez, Silvia Moreno (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* **31**, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>

Ahmed AF, Attia FAK, Liu Z, Li C, Wei J, Kang W (2019) Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Sci Hum Well*. **8**, 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* **127**, 183–198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>

Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E (2016) Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* **64**, 997–1045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>

Arranz E, Jaime L, García-Risco MR, Fornari T, Reglero G, Santoyo S (2015) Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *Int J Food Sci Techn* **50**, 674–681. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12656>

Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Lolingers J (1992) Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* **22**, 257–268. <https://doi.org/10.3109/00498259209046624>

Awada F, Hamade K, Kassir M, Hammoud Z, Mesnard F, Rammal H, Fliniaux O (2023) *Laurus nobilis* Leaves and Fruits: A Review of Metabolite Composition and Interest in Human Health. *App Sci* **13**, 4606. <https://doi.org/10.3390/app13074606>

Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F (2017) Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Ind Crop Prod* **107**, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.063>

Bano S, Ahmad N, Sharma AK (2016) Phytochemical investigation and evaluation of anti-microbial and anti-oxidant activity of *Foeniculum vulgare* (fennel). *Int J Pharm Sci Res* **7**, 226007.

Barrows JN, Jameson GB, Pope MT (1985) Structure of a heteropoly blue. The four-electron reduced  $\beta$ -12-molybdophosphate anion. *J Am Chem Soc* **107**, 1771–1773. <https://doi.org/10.1021/ja00292a059>

Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Berker KI, Gueclue K, Tor I, Demirata B, Apak R (2010) Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Anal Methods* **3**, 154–168. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9117-9>

Boualam K, Ibork H, Lahboub Z, Sobeh M, Taghzouti K (2024) Mentha rotundifolia (L.) Huds. And Salvia officinalis L. hydrosols mitigate aging related comorbidities in rats. *Aging Neurosci* **16**, 1365086. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1365086>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Techn* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Britannica (2023) Bay laurel. <https://www.britannica.com/plant/laurel-plant-Laurus-genus>. Pristupljeno: 11. siječnja 2024.

Chatterjee S, Goswami N, Bhatnagar P (2012) Estimation of Phenolic Components and in vitro Antioxidant Activity of Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Ajwain (*Trachyspermum ammi*) seeds. *Adv Biores* **3**, 109-118.

Chimactiv (2024) Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH° assay. <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe/1>. Pristupljeno: 11. lipnja 2024.

Christaki S, Bouloumpasi E, Lalidou E, Chatzopoulou P, Irakli M (2022) Bioactive Profile of Distilled Solid By-Products of Rosemary, Greek Sage and Spearmint as Affected by Distillation Methods. *Molecules* **27**, 9058. <https://doi.org/10.3390/molecules27249058>

Chrysargyris A, Mikallou M, Petropoulos S, Tzortzakis N (2020) Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agron* **10**, 727. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10050727>

D`Amato S, Serio A, Chaves Lopez C, Paparella A (2018) Hydrosols: Biological activity and potencijal as antimicrobials for food applications. *Food Control* **86**, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>

Da Silva WMF, Kringel DH, de Souza EJD, da Rosa Zavareze E, Dias ARG (2022) Basil essential oil: Methods of extraction, chemical composition, biological activities, and food applications. *Food Bioprocess Technol* **15**, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02690-3>.

De Oliveira MS, Silva S, Da Costa WA (2020) Essential Oils: Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. *IntechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.87266>

Dragičević A, Kitić D, Stanojević LJ, Nešić I, Pavlović D (2024) Antioxidant activity of hydrolate obtained from the aerial part of sweet basil *Ocimum basilicum* L. *Acta Med* <http://dx.doi.org/10.5633/amm.2024.0416>

Gaspar-Pintilieș A, Mihai E, Ciucan T, Popescu AF, Luntraru C, Tomescu J, Craciunescu O (2022) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition capacity of hydrosols from lamiaceae plants for biopesticide use: role of phenolics. *Int J Food Prop* **25**, 996-1008. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2071289>

Georgiev V, Ananga A, Ivayla D, Illian B, Gochev V, Tsołova V (2019) Chemical Composition, In Vitro Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activities of Essential Oils and Hydrosols from Native American Muscadine Grapes. *Molecules* **24**, 3355. <https://doi.org/10.3390/molecules24183355>

Habtemariam S (2016) The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, New York **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/2680409>

Hamidpour M, Hamidpour R, Hamidpour S, Shahlari M (2014) Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *J Tradit Complement Med*, **4**, 82-88. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.130373>

He W, Huang B (2011) A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *J Med Plants Res* **5**, 3595-3600.

Hegerman AE, Riedl KM, Jones G, Sovik KN, Rechard NT, Hartzfeld PW, Reichel TL (1998) High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J Agric Food Chem* **46**, 1887–1892. <https://doi.org/10.1021/jf970975b>

Hiregoudar S, Revanna ML, Sadananda MHS, Kalpana GKB, Chavan M (2023) Comprehensive Analysis of Physicochemical and Antioxidant Properties of Hydro Distilled Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil. *Int J Plant Sci* **35**, 1186-1196. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2023/v35i203916>



- Huang D, Boxin OU, Prior PL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* **55**, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hurrell R (2003) Influence of vegetable protein source on trace elements and mineral bioavailability. *J Nutr*, **133**, 29735-29775. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.29735>
- Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* **108**, 986-995. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010>
- Jakubczyk K, Tuchowska A, Janda-Milczarek K (2021) Plant hydrolates – Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomed Pharmacother* **142**. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112033>
- Kalođera Z, Blažević N, Salopek N, Jurišić R (1998) Eterična ulja (aetherolea). *Farmaceutski glasnik* **54**, 195-210.
- Kammoun El Euch S, Hassine DB, Cazaux S, Bouzouita N, Bouajila J (2019) *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *S Afr J of Bot* **120**, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.010>.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S (2009) Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal Methods* **2**, 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Lahmar I, Mosbahi N, Yotova L (2023) Hydrosol extract from aerial parts of *Rosmarinus officinalis* cultivated in Metouia oasis - Biochemical composition and enzymes content. *J oasis agric sustain dev* <https://doi.org/10.56027/JOASD.182023>
- Lijewski A (2023) Pure vs. Synthetic Essential Oils. <https://sobotanical.com/blogs/soboblog/natural-vs-synthetic-essential-oils>. Pristupljeno: 20.lipnja 2024.
- Lima TS, Silva MFS, Nunes XP, Colombo AV, Oliveira HP, Goto PL, Blanzat M, Piva HL, Tedesco AC, Siqueira-Moura MP (2021) Cineole-containing nanoemulsion: Development, stability, and antibacterial activity. *Chem Phys Lipids* **239**. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105113>
- Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* **613**, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Mahai E, Gaspar-Pintilieșcu A, Ciucan T, Prelipcean AM, Tomescu J, Neagu M, Craciunescu O (2023) Comparative Study on the Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Fennel Hydrolates. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XXVII, ISSN 2285-1364

Maleš I, Dragović-Uzelac V, Jerković I, Zorić Z, Pedišić S, Repajić M, Elez Garofulić I, Dobrinić A (2022) Non-Volatile and Volatile Bioactives of *Salvia officinalis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Laurus nobilis* L. Extracts with Potential Use in the Development of Functional Beverages. *Antioxidans* **11**, 1140. <https://doi.org/10.3390/antiox11061140>

Marinova G, Batchvarov (2011) Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg J of Agric Sci* **17**, 11-24.

Mihai AL, Popa ME (2013) Essential oils utilization in food industry -a literature review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XVII, ISSN 2285-1364, 187-192.

Mills S, Bone K (2005) *The Essential Guide to Herbal Safety*, Churchill Livingstone, London. str. 558-559.

Miljanovic A, Bielen A, Grbin D, Marijanović Z, Andlar M, Rezić T, Roca S, Jerković I, Vikić-Topić D, Dent M (2020) Effect of Enzymatic, Ultrasound, and Reflux Extraction Pretreatments on the Yield and Chemical Composition of Essential Oils. *Molecules* **25**, 4818. <https://doi.org/10.3390/molecules25204818>

Miljanović A, Dent M, Grbin D, Pedišić S, Zorić Z, Marijanović Z, Jerković I, Bielen A (2023) Sage, Rosemary, and Bay Laurel Hydrodistillation By-Products as a Source of Biactive Compounds, *Plants* **12**, 2394. <https://doi.org/10.3390/plants12132394>

Moharram HA, Youssef MM (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J Food Sci Techn* **11**, 31-42.

Munteanu G, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Nehir El S, Karagozlu N, Karakaya S, Sahin S (2014) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food Nutr Sci* **5**, 10. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.52013>

Ollerton RD Bosiljak uzgoj - u teglici, u kući, upotreba. <https://krenizdravo.dnevnik.hr/prehrana/zacini/bosiljak-uzgoj-u-teglici-u-kuci-upotreba>.  
Pristupljeno 11. siječnja 2024.

Olmedo RH, Asensio CM, Grosso NR (2015) Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. *In Crops Prod* **69**, 21-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.005>

Ouedraogo IWK, Winter JD, Gerbaux P, Bonzi-Coulibaly (2013) Volatility profiles of monoterpenes loaded onto cellulosic-based materials. *Ind Crop Prod* **51**, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.032>

Ozyürek M, Bektasoglu B, Güçlü K, Güngör N, Apak R (2008) Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl- $\beta$ -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta* **630**, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.057>

Pereira OR, Catarino MD, Afonso AF, Silva AMS, Cardoso SM (2018) *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules* **23**, 3169. <https://doi.org/10.3390/molecules23123169>

Politeo O, Ćurlin P, Brzović P, Auzende K, Magne C, Generalić Mekinić I (2024) Volatiles from French and Croatian Sea Fennel Ecotypes: Chemical Profiles and the Antioxidant, Antimicrobial and Antiageing Activity of Essential Oils and Hydrolates. *Foods* **13**, 695. <https://doi.org/10.3390/foods13050695>

Proto MR, Biondi E, Baldo D, Levoni M, Filippini G, Modesto M, Di Vito M, Bugli F, Ratti C, Mlinardi P, Mattarelli P (2022) Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. *Microorganisms* **10**, 702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040702>

Pxfuel (2024) Fennel wallpapers. <https://www.pxfuel.com/en/search?q=fennel>. Pristupljeno 11. siječnja 2024.

Ratnam KV, Ankola DD, Bahrdwai JKV, Sahana DK, Kavar MNV (2006) A review: Role of antioxidant in prophylaxis and therapy. A pharmaceutical prospective. *JCR* **11**, 189-207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>

Regoli F, Winston GW (1999) Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**, 96–105. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8637>

Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI (2012) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind Crops Prod* <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.012>

Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind Crops Prod* **44**, 437-445. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.012>

- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants: antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem* **91**, 621-632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Sadgrove NJ, Padilla-Gonzalez GF, Phumthum M (2022) Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants* **11**, 789. <https://doi.org/10.3390/plants11060789>
- Sadgrove, NJ, Jones GL (2015) A contemporary introduction to essential oils: Chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture* **5**, 48–102. <https://doi.org/10.3390/agriculture5010048>
- Saeed K, Pasha I, Jahangir Chughtai MF, Ali Z, Bukhari H, Zuhair M (2022) Application of essential oils in food industry: challenges and innovation. *J Essent Oil Res* **34**, 97–110. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2029776>
- Saraš A (2021) Čaj od ružmarina – ljekovitost, upotreba i nuspojave. <https://prirodno-lijekite.com/ljekovito-bilje/caj-od-ruzmarina/>. Pristupljeno: 10. siječnja 2024.
- Sarma YS, Nirmal Babu K, Aziz S (2014) Encyclopedia of Agriculture and Food Systems: Spices and Aromatics. *Elsevier* **5**, 211-234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00153-4>
- Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA (2011) Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules* **16**, 1366-1377. <https://doi.org/10.3390/molecules16021366>
- Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q (2020) Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *Int J Food Prop*, **23**, 1961-1970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
- Sharopov F, Valiev A, Satyal P, Gulmurodov I, Yusufi S, Satzer WN, Wink M (2017) Cytotoxicity of the Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare*) from Tajikistan. *Foods* **6**, 73. <http://dx.doi.org/10.3390/foods6090073>
- Shi L, Zhao W, Yang Z, Subbiah V, Suleria HAR (2022) Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ Sci Pollut Res Int* **29**, 81112-81129. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>

- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Sırıken B, Yavuz C, Güler A (2018) Antibacterial Activity of *Laurus nobilis*: A review of literature. *Med Sci Discov* **5**, 374-379. <https://doi.org/10.17546/msd.482929>
- Skrypnik L, Novikova A, Tokupova E (2019) Improvement of Phenolic Compounds, Essential Oil Content and Antioxidant Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Depending on Type and Concentration of Selenium Application. *Plants* **8**, 458. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8110458>
- Stanojevic LJ, Marjanovic-Balaban Ž, Kalaba V, Stanojevic J, Cvetkovic D, Cakic M (2017) Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil. *J Essent Oil Bear Plants* **20**, 1557-1569. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1401963>
- Šovljanski O, Saveljić A, Aćimović M, Šeregelj V, Pezo L, Tomić A, Četković G, Tešević V (2022) Biological Profiling of Essential Oils and Hydrolates of *Ocimum basilicum* var. *Genovese* and var. *Minimum* Originated from Serbia. *Processes* **10**, 1893. <https://doi.org/10.3390/pr10091893>
- Tai J, Cheung S, Wu M, Hasman D (2012) Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomed* **19**, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.012>
- Tongnuanchan P, Benjakul S (2014) Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J Food Sci* **79**, 231-249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Turek C, Stintzing F (2011) Evaluation of Selected Quality Parameters to Monitor Essential Oil Alteration during Storage. *J Food Sci* **76**, 9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02416.x>
- Turek C, Stintzing FC (2013) Stability of Essential Oils: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **12**, 40-53. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Uyoh EA, Chukwurah PN, Davis IA, Bassey AC (2013) Evaluation of Antioxidant Capacity of Two *Ocimum* Species Consumed Locally as Spices in Nigeria as a Justification for Increased Domestication. *Am J Plant Sci* **4**, 222-230. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.42029>
- Waterhouse AL (2003) Determination of total phenolics. *Curr protocol food Anal Chem* **6**. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>

Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* **105**, 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>

Xylia P, Chrysargyris A, Tzortzakis N (2024) The Postharvest Safety and Quality of Fresh Basil as Affected by the Use of Cypriot Oregano (*Origanum dubium*) Extracts. *Hortic* **10**, 159. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10020159>

Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M (2010) Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol* **48**, 3144-3152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis

---

Doris Barić