

Određivanje antioksidacijskih svojstava ekstrakata melise

Marević, Katarina

Undergraduate thesis / Završni 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:159:965649>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Katarina Marević
0058220000

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA EKSTRAKATA MELISE
ZAVRŠNI RAD**

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: "Održivi pristup u razvoju jestivih prevlaka u povećanju trajnosti svježe jadranske ribe" (HRZZ-IP-2022-10-1837)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje antioksidacijskih svojstava ekstrakata melise

Katarina Marević, 0058220000

Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost ekstrakata biljke *Melissa officinalis L.* dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom. Ekstrakcije su provedene s demineraliziranom vodom te 30%, 70% i 96%-tnom vodenom otopinom etanola pri temperaturama od 40 °C, 60 °C i 80 °C i vremenu trajanja od 5 i 10 minuta. Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je DPPH i FRAP metodom, primjenom UV/Vis spektroskopije. Prema nalazu DPPH analize najviši antioksidativni potencijal, pri svim temperaturama, pokazuju 70%-tni etanolni ekstrakti dok se rezultati FRAP analize razlikuju pri različitim temperaturama. Pri 40 °C najveću aktivnost pokazuju 30%-tni etanolni, pri 60 °C 70%-tni etanolni ekstrakti, a pri 80 °C vodeni ekstrakti. Vrijeme trajanja tretmana je utjecalo na antioksidativnu aktivnost i pritom su veće razlike u rezultatima zamijećene u FRAP analizi. Zaključno, na antioksidativnu aktivnost ekstrakata biljke *Melisse officinalis L.* utječu temperatura i vrijeme ekstrakcije te otapalo koje se koristi za ekstrakciju.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost, DPPH metoda, FRAP metoda, mikrovalna ekstrakcija, *Melissa officinalis L.*

Rad sadrži: 24 stranica, 18 slika, 4 tablica, 19 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semencić

Datum obrane: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for physical chemistry and corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of antioxidant properties of melissa extracts

Katarina Marević, 0058220000

Abstract:

The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of *Melissa officinalis* L. plant extracts obtained through microwave extraction. Extractions were carried out using demineralized water and 30%, 70%, and 96% aqueous ethanol solutions at temperatures of 40 °C, 60 °C, and 80 °C, with extraction times of 5 and 10 minutes. The antioxidant activity of the samples was assessed using the DPPH and FRAP methods with UV/Vis spectroscopy.

According to the DPPH analysis results, the 70% ethanol extracts exhibited the highest antioxidant potential across all temperatures. In contrast, the FRAP analysis results varied with temperature: at 40 °C, the 30% ethanol extracts showed the highest activity; at 60 °C, the 70% ethanol extracts were the most active; and at 80 °C, the water extracts demonstrated the highest activity. The extraction duration influenced antioxidant activity, with more significant differences observed in the FRAP analysis results. In conclusion, the antioxidant activity of *Melissa officinalis* L. extracts is influenced by the temperature and duration of extraction, as well as the type of solvent used.

Keywords: antioxidant activity, DPPH method, FRAP method, microwave extraction, *Melissa officinalis* L.

Thesis contains: 24 pages, 18 figures, 4 tables, 19 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Mojca Čakić Semenčić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: June 17, 2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>MELISSA OFFICINALIS L.</i>	2
2.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA MIKROVALOVIMA (MAE).....	4
2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	6
2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FRAP METODOM	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. BILJNI MATERIJALI	9
3.1.2. KEMIKALIJE.....	9
3.1.3. APARATURA I PRIBOR.....	10
3.2. METODE	12
3.2.1. PRIPREMA UZORKA.....	12
3.2.2. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA UZORAKA.....	12
3.2.3. FILTRACIJA UZORAKA.....	13
3.2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI DPPH METODOM	13
3.2.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FRAP METODOM.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	16
4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FRAP METODOM	17
4.3. GRAFIČKI PRIKAZ PODATAKA	18
5. ZAKLJUČCI	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Antioksidansi su tvari koje mogu odgoditi ili spriječiti oksidaciju supstrata uzrokovanu slobodnim radikalima tako da im doniraju elektrone. Slobodni radikali mogu izazvati oštećenja DNK i stanične membrane te uzrokovati razne bolesti kod ljudi što je razlog povećanog interesa za istraživanjem tvari i spojeva s antioksidativnim učinkom (Gulcin i Alwasel, 2023).

Melissa officinalis L. ljekovita je biljka čija eterična ulja i ekstrakti pokazuju razna biološka i farmakološka svojstva. Mnoga istraživanja su pokazala da ekstrakti ove biljke smanjuju oksidativni stres i oštećenja DNK (Petrisor i sur., 2022).

U ovom završnom radu opisana je antioksidativna aktivnost ekstrakata biljke *Melissa officinalis L.* dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom pri različitim uvjetima temperature i trajanja ekstrakcije uz upotrebu različitih otapala. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je brza i djelotvorna metoda koja se danas najčešće koristi za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnih materijala (Starmans i sur., 1996).

Nakon mikrovalne ekstrakcije, antioksidativni potencijal ekstrakata određen je primjenom dvije metode, DPPH i FRAP. DPPH se temelji na uklanjanju DPPH radikala što rezultira promjenom boje uzoraka. FRAP se temelji na prijenosu elektrona pri čemu također dolazi do promjene obojenja. Obje metode su brze, efikasne i ekonomične te se mjerenja vrše uz pomoć UV/Vis spektrofotometra.

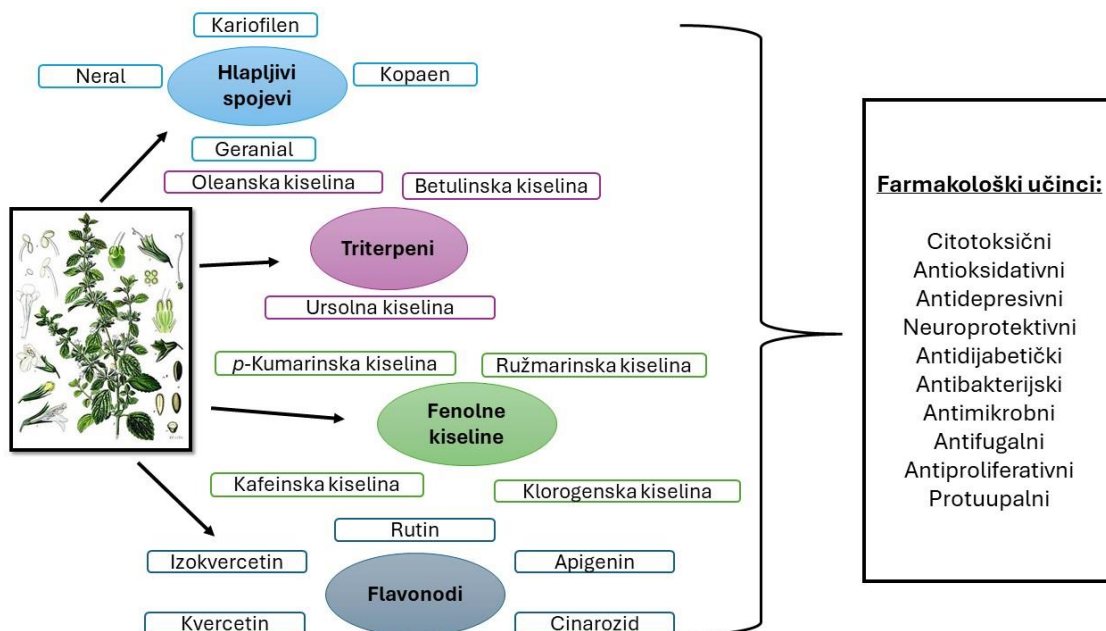
Cilj rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost ekstrakata te utvrditi utjecaj različitih načina provođenja mikrovalne ekstrakcije na njihov antioksidativni potencijal.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Melissa officinalis* L.

Melissa officinalis L. ljekovita je biljka koja se koristi u tradicionalnoj medicini. Ljekovite biljke imaju razna biološka svojstva i sadrže biološki aktivne tvari koje se nalaze u različitim dijelovima same biljke te se mogu ekstrahirati iz korijena, listova, plodova, kore ili cijele biljke. Melisa je aromatična višegodišnja biljka koja raste u zapadnoj Aziji i u Europi, točnije u mediteranskoj regiji. Drugi nazivi za nju su limunski balzam, medni balzam, balzam mente ili ljekoviti matičnjak. Pripada obitelji metvice *Lamiaceae*, jestiva je i doseže visinu od 60 do 100 cm. Eterično ulje i ekstrakti *Melisse officinalis* sadrže spojeve sa velikim farmakološkim potencijalom za medicinsku upotrebu.

Kemijskom analizom sastava *Melisse officinalis* utvrđeno je da biljka sadrži flavonoide, fenolne kiseline, tanine, terpenoide i eterična ulja. Glavni aktivni sastojci su hlapljivi spojevi, triterpeni, fenolni spojevi i flavonoidi (slika 1). Kemijski sastav ekstrakata biljke razlikuje se ovisno o načinu provođenja ekstrakcije i ovisi o dijelu biljke koji se analizira, o podrijetlu biljke, klimatskim i geografski uvjetima i vremenu berbe. Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti u koje se svrstavaju flavonoidi i fenolne kiseline i važni su bioaktivni sastojci *Melissa officinalis*. Ti spojevi pokazuju jaka antioksidativna svojstva, a najzastupljeniji su ružmarinska, kafeinska, klorogenska i ferulinska kiselina. Ovisno o metodi ekstrakcije i upotrijebljenom otapalu mogu se dobiti različiti sastavi ekstrakata što utječe na samu biološku aktivnost. Eterično ulje dobiveno iz listova *Melissa officinalis* izdvaja se u malim količinama i ima važne farmakološke značajke. Glavne komponente eteričnog ulja osušenih listova ove biljke su hlapljivi spojevi prikazani u Tablici 1. U raznim studijama koje su proučavale ekstrakte listova *Melisse officinalis*, identificirani su fenolni spojevi koji su povezani sa antivirusnim, antitumorskim, antidepresivnim, anti-Alzheimerovim, antibakterijskim i neuroprotektivnim učincima. Ekstrakti melise pokazali su i dobar citotoksični učinak na stanice raka dojke i raka debelog crijeva te smanjenje oksidativnog stresa i oštećenja DNK. Sve više se razvijaju sustavi dostave lijekova koji sadrže prirodne aktivne tvari s ciljem poboljšanja stabilnosti, topljivosti i apsorpcije u tijelu. Tehnologija nano-nosača pokazala se kao tehnologija sa puno prednosti, a *Melissa officinalis* je jedna od biljaka iz čijih se dijelova izdvajaju biološki aktivne komponente koje se unose u sustave kontroliranog otpuštanja (Petrisor i sur., 2022).



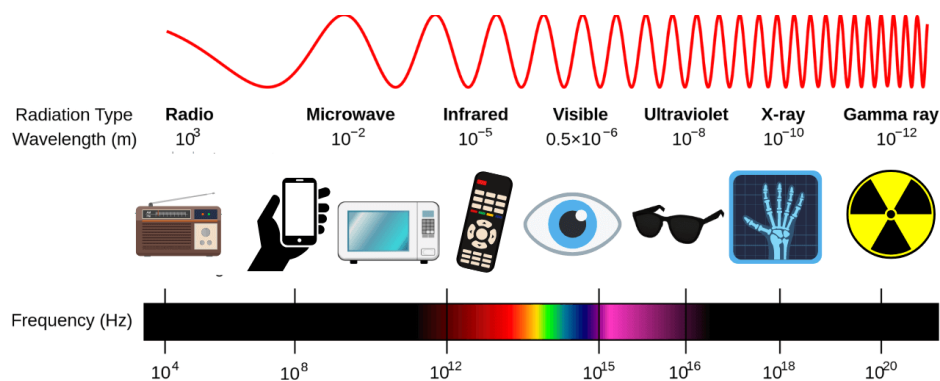
Slika 1. Sastav *Melissa officinalis* i njezini farmakološki učinci (prema Petrisor i sur., 2022)

Tablica 1. Udio većinskih komponentata u esencijalnom ulju ekstrahiranom iz sušenih listova *Melissa officinalis* (Petrisor i sur., 2022)

Komponenta	Koncentracija komponenti esencijalnog ulja, (%)
Kariofilen	1,06-6,8
Kariofilen oksid	1,3-43,55
Citronelal	0,4-20,3
Geranial (ciral A)	6,22-51,21
Geranil acetat	0,5-19,3
Neral (ciral B)	4,28-35,02
α -Kadinol	5,64
α -Kopaen	0,1-7,02
β -Kariofilen	1,3-29,14

2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

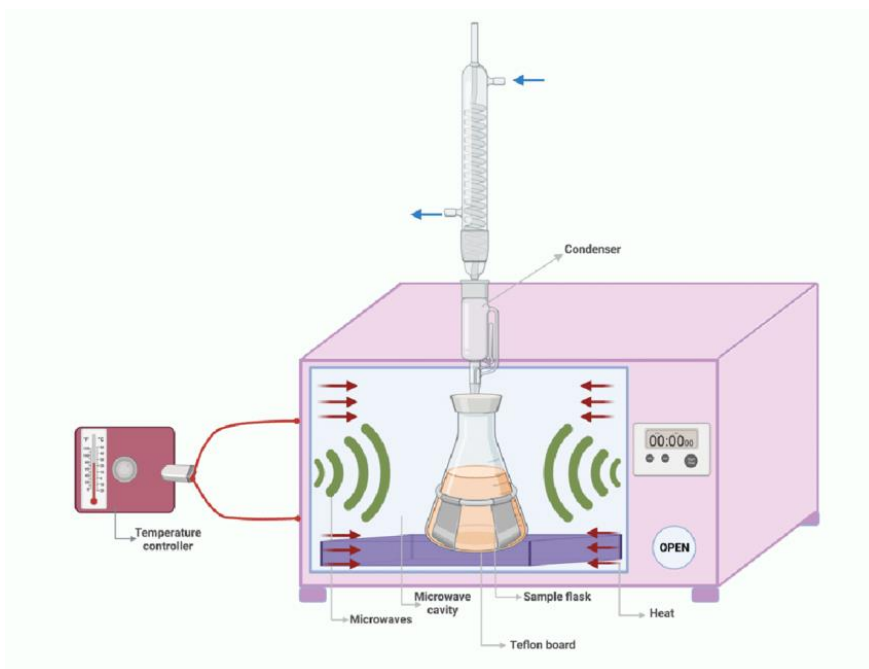
Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva oscilirajuća okomita polja: električnog i magnetskog. Područje mikrovalnog zračenja (slika 2) se u elektromagnetskom spektru nalazi između radio valova i infracrvenih valova, s pripadajućim valnim duljinama od 1 cm do 1 m odnosno frekvencijama između 1 i 300 GHz (Neral i sur., 2006).



Slika 2. Spektr elektromagnetskog zračenja (Helmenstine, 2023)

Dielektrično zagrijavanje pomoću mikrovalova ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira njihovu energiju i pretvori je u toplinsku energiju. Mikrovalovima potpomognuto zagrijavanje posljedica je rotacije polarnih molekula koje nastoje slijediti smjer izmjeničnog električnog polja, pritom dolazi do ravnomjernog zagrijavanja otopine u cijelom volumenu (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005.; Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000.).

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (slika 3) danas se najčešće koristi za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnih materijala zbog kratkog trajanja ekstrakcije, velike učinkovitosti i smanjene upotrebe otapala, u usporedbi s klasičnom toplinskom ekstrakcijom. Tretiranjem biljnog materijala mikrovalovima pospješuje se ekstrakcija sekundarnih metabolita i aromatskih tvari. Zagrijano otapalo uzrokuje pucanje stanične membrane, a time i oslobađanje i difuziju sekundarnih metabolita koji se većinom nalaze u membrani ili citoplazmi (Starmans i sur., 1996).



Slika 3. Shematski prikaz ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Fărcaș i sur., 2022)

Razlikujemo dvije vrste komercijalno dostupnih sustava za mikrovalnu ekstrakciju: ekstrakcija u zatvorenim posudama s kontrolom temperature i tlaka te ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama, pri atmosferskom tlaku (Kaufmann i Christen, 2002). Ekstrakcija u zatvorenoj posudi koristi se kada su uvjeti ekstremni (visoka temperatura i tlak). Odabir parametara i njihovih vrijednosti ovisi o topljivosti i stabilnosti ciljnih komponenti, a također o interakcijama s drugim komponentama prisutnima u biljnom materijalu. Ključni parametri koji utječu na proces ekstrakcije su:

- Odabir otapala

Otapala koja se koriste u mikrovalnoj ekstrakciji obično su ista kao i ona u tradicionalnoj. Njihov odabir ovisi o topivosti ciljnih komponenti i interakcijama između početnog materijala i otapala te o dielektričnoj konstanti otapala odnosno sposobnosti apsorpcije mikrovalova (Destandau i sur., 2013). Najčešće korištena otapala su metanol, etanol, voda, njihove smjese ili smjesa heksana i etanola.

- Temperatura i tlak

Temperatura doprinosi povećanju prinosa ciljnih spojeva. Pri višim temperaturama smanjuje se viskoznost otapala i površinska napetost te povećava vlaženje matriksa. Tlak je važan ukoliko temperatura prelazi temperaturu vrelišta otapala što je bitno kod ekstrakcije termolabilnih spojeva jer se optimiranjem tlaka smanjuje mogućnost njihove degradacije (Hemwimon i sur., 2007).

- Vrijeme ekstrakcije

Mikrovalna ekstrakcija u usporedbi s drugim metodama skraćuje vrijeme ekstrakcije i traje najčešće između 30 sekundi i 5 minuta (Ballard i sur., 2010; Zhang i sur., 2008). Trajanje ovisi o učincima vremena zračenja na interakcije između materijala i mikrovalova. Ukoliko se ekstrahiraju termolabilne komponente valja imati na umu da dugotrajno zagrijavanje može dovesti do njihove degradacije. Prinos ekstrakcije može se povećati ako se provodi višekratno u kraćim ciklusima (Destandau i sur., 2013).

- Snaga mikrovalova

Snaga mora biti podešena tako da se smanji vrijeme potrebno za postizanje određene temperature uzorka, a pritom ne dođe do pregrijavanja samog sustava i isparavanja otapala. Snaga mikrovalova koja se najčešće koristi je 600-1000 W za zatvoreni sustav i 250 W za otvoreni sustav (Kaufman i Christen, 2002) iako i ona od 30 do 150 W pozitivno utječe na prinose ekstrakcije (Mandal i sur., 2007).

- Svojstva uzorka

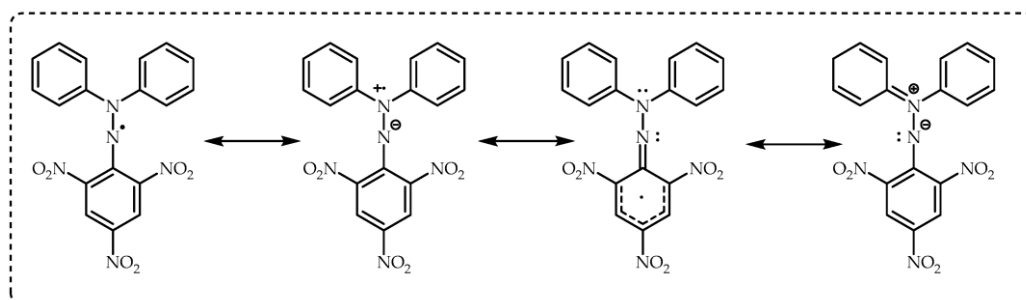
Prirodna prisutnost vode u uzorku je poželjna jer voda ima veliki dipolni moment i snažno apsorbira mikrovalove. Ukoliko se koristi suhi materijal nužno ga je prije ekstrakcije rehidrirati vodom. Sjemenke treba namakati u vodi prije same ekstrakcije. Preporučena veličina čestica biljnog materijala je 100 µm-2 mm (Wang i Weller, 2006).

2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Oksidacijske reakcije su neophodne za preživljavanje stanica. Aerobna stanična respiracija osigurava energiju iz organskih molekula, ali pri tome mogu nastati slobodni radikali koji oštećuju stanične strukture. Slobodni radikali sadrže slobodne elektrone te su iznimno reaktivni. Danas je poznato da su u organizmu slobodni radikali u velikoj mjeri povezani sa oksidativnim stresom te su dio uzročnika raznih bolesti poput akutnih upala, dijabetesa, Alzheimerovog i Parkinsonovog poremećaja i drugih.

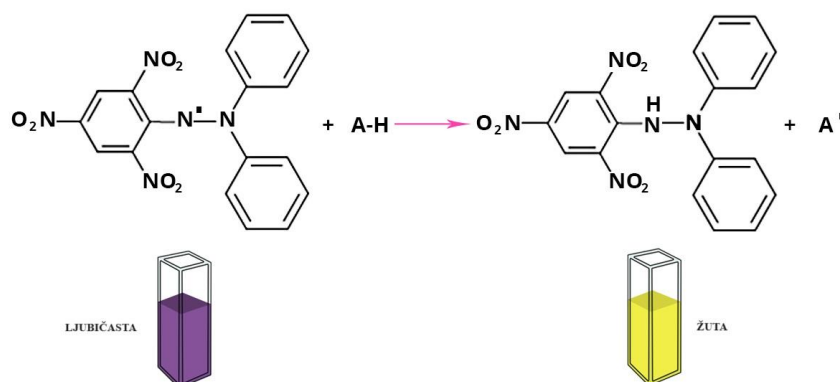
Antioksidansi su definirani kao tvari koje mogu odgoditi ili spriječiti oksidaciju supstrata, čak i ako su prisutni u niskim koncentracijama. Doniraju elektrone slobodnim radikalima i na taj način minimaliziraju oksidativna oštećenja. Učinkovitost antioksidansa ovisi o raznim parametrima sustava, a neki od najvažnijih su temperatura, strukturne osobine, koncentracija i fizičko stanje sustava. Antioksidansi prirodnog podrijetla se koriste u većoj mjeri u odnosu na sintetske antioksidanse.

Jedna od najčešćih metoda procjene antioksidativnog kapaciteta koristi radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH \cdot) koji su Goldschmidt i Renn otkrili 1922. godine (slika 4).



Slika 4. Rezonancijske strukture radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH \cdot) (Gulcin i Alwasel, 2023)

Metoda se temelji na spektrofotometrijskim mjerenjima sposobnosti antioksidansa za uklanjanje DPPH radikala čija je ljubičasta boja izuzetno stabilna i intenzivna. Preuzimanjem atoma vodika iz antioksidansa DPPH se reducira u odgovarajući hidrazin i pritom iščezava ljubičasto obojenje, a boja otopine prelazi u blijedožutu (slika 5). DPPH radikal maksimalno apsorbira pri 517 nm, a smanjenje intenziteta ove vrpce, uslijed prisutnosti antioksidansa, prati se pomoću UV/Vis spektroskopije. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala se većinom određuje u organskim otapalima (metanol ili etanol), uz koncentracija radikala od 0,05 mM do 1,5 M.



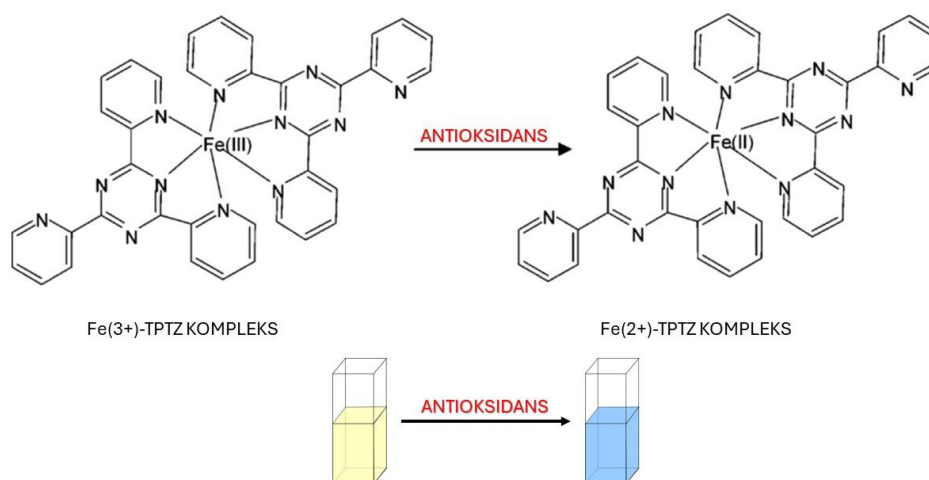
Slika 5. Redukcija DPPH radikala i promjena boje iz ljubičaste u žutu (Chimactiv, 2024.)

Ova se metoda koristi za određivanje antioksidativne sposobnosti čistih antioksidansa, ali i smjesa fenolnih spojeva i biljnih ekstrakata (Gulcin i Alwasel, 2023).

2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

FRAP (eng. *Ferric ion reducing antioxidant power*) je metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na prijenosu elektrona. U prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa kationa željeza (Fe^{3+}) i liganda 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) u intenzivno plavo obojeni kompleks Fe^{2+} (slika 6). Antioksidacijska aktivnost se prati spektrofotometrijski kao povećanje apsorbancije pri 593 nm, a provodi se u kiselim uvjetima ($\text{pH} = 3,6$) kako bi se pospješila topljivost željeza i potaknuo transfer elektrona.

FRAP analiza je jednostavna, brza, ekonomična i ne zahtijeva specijalnu opremu. Izvorno se koristila za mjerenje redukcijske moći u plazmi, ali je primjena proširena na određivanje antioksidativne aktivnosti. Budući da se temelji na prijenosu elektrona i ne koristi slobodne radikale sugerira se njeno korištenje u kombinaciji s drugim metodama kako bi se razlikovali dominantni mehanizmi aktivnosti raznih antioksidansa (Zhong i Shahidi, 2015). Kao standardni antioksidans često se upotrebljava askorbinska kiselina (Benzie i Strain, 1996).



Slika 6. Reakcija redukcije Fe^{3+} -TPTZ kompleksa u Fe^{2+} -TPTZ kompleks u prisutnosti antioksidansa i promjena boje otopine (vlastita fotografija)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijali

Osušena i usitnjena biljka *Melissa officinalis L.*, Suban d.o.o., Srbija (slika 7)



Slika 7. Uzorak biljke *Melissa officinalis L.* (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije

- deionizirana voda
- 30%, 70% i 96%-tna vodena otopina etanola
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich)
- 37%-tna klorovodična kiselina (Kemika)
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin, TPTZ (Sigma-Aldrich)
- željezov(III) klorid heksahidrat (99%, Kemika)
- acetatni pufer (pH = 3,6)
- natrijev acetat trihidrat (99,5%, Lachner s.r.o.)
- glacijalna octena kiselina (Alkaloid Skoplje)
- askorbinska kiselina (Poljo-Evelin d.o.o.)

3.1.3. Aparatura i pribor

- tehnička vaga
- UV/Vis spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25, Perkin Elmer, SAD (slika 8)
- mikrovalni reaktor Milestone Start S, Milestone Srl, Italija (slika 9)
- vortex miješalica MS2 minishaker, IKA, Njemačka
- električni usitnjivač
- Büchnerov lijevak
- filter papir
- Falcon i staklene epruvete
- laboratorijske šprice
- mikrofilter 0,2 μm PTFE
- automatske pipete volumena 100-1000 μL
- kvarcne kivete, Perkin Elmer Instruments, SAD
- laboratorijske čaše
- graduirana pipeta i propipeta
- tikvica sa okruglim dnom
- hladnjak
- vodena kupelj Bandelin sonorex digiplus, Njemačka
- špatula



Slika 8. UV/Vis spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25 (TTF, 2024)



Slika 9. Mikrovalni reaktor Milestone Start S (vlastita fotografija)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka

Pomoću električnog usitnjivača osušena biljka *Melissa officinalis L.* usitni se na što manje čestice. U tikvicu s okruglim dnom izvaži se 2 grama usitnjenog biljnog materijala i otopi u 100 mL određenog otapala (tablica 2) uz ručno miješanje.

Tablica 2. Uvjeti mikrovalnih ekstrakcija

40 °C, voda, 5 min.	60 °C, voda, 5 min.	80 °C, voda, 5 min.
40 °C, voda, 10 min.	60 °C, voda, 10 min.	80 °C, voda, 10 min.
40 °C, 30% etanol, 5 min.	60 °C, 30% etanol, 5 min.	80 °C, 30% etanol, 5 min.
40 °C, 30% etanol, 10 min.	60 °C, 30% etanol, 10 min.	80 °C, 30% etanol, 10 min.
40 °C, 70% etanol, 5 min.	60 °C, 70% etanol, 5 min.	80 °C, 70% etanol, 5 min.
40 °C, 70% etanol, 10 min.	60 °C, 70% etanol, 10 min.	80 °C, 70% etanol, 10 min.
40 °C, 96% etanol, 5 min.	60 °C, 96% etanol, 5 min.	80 °C, 96% etanol, 5 min.
40 °C, 96% etanol, 10 min.	60 °C, 96% etanol, 10 min.	80 °C, 96% etanol, 10 min.

3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija uzoraka

Tikvica s uzorkom, u koju je prethodno dodan magnetski mješač postavi se u mikrovalni reaktor (slike 9 i 10). Snaga se fiksira na 400 W, a temperatura i vrijeme trajanja tretmana su se mijenjali tijekom provođenja ekstrakcije (slika 11 i tablica 2)



Slika 10. Uzorak u mikrovalnom reaktoru (vlastita fotografija)



Slika 11. Podešavanje parametara eksperimenta (vlastita fotografija)

3.2.3. Filtracija uzoraka

Uzorci se nakon mikrovalne ekstrakcije profiltriraju pomoću Bucherovog lijevka i filter papira, te preliju u Falcon epruvete, označe te pohrane u hladnjak (slika 12).



Slika 12. Profiltrirani i označeni uzorci u hladnjaku (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Otapanjem 5,92 mg DPPH u 100 mL 96%-tnog etanola pripravljena je 0,15 mM otopina DPPH, čija je apsorbancija pri 517 nm približno 1. Tikvica s otopinom DPPH obloži se aluminijskom folijom i čuva u hladnjaku do mjerenja. Prije mjerenja uzorci su homogenizirani i uz pomoć šprice filtrirani kroz PTFE mikrofiltre (0,2 μ m). Kao slijepa proba koristi se 2,5 mL 96% etanola, a referenti uzorak čine 2,5 mL otopine DPPH i 100 μ l 96% etanola. Apsorbancija referentog

uzorka i slijepe proba mjeri se svakog dana jer se s vremenom apsorbanacija DPPH pri 517 nm mijenja. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka, u kivetu koja sadrži 2,5 mL otopine DPPH doda se 100 µl profiltriranog ekstrakta, kiveta se protrese i smjesa ostavi 30 minuta u tami. Potom se pomoću UV/Vis spektrofotometra (slika 8) mjeri apsorbanacija uzorka pri 517 nm, za svaki uzorak tri puta. Ukoliko se apsorbanacija pri 517 nm očitava ispod 0,1, uzorak je potrebno razrijediti. Jednadžba koja se koristi za izračun antioksidacijske aktivnosti je sljedeća:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[\frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100\%$$

gdje: A_c - apsorbanacija referentnog uzorka pri $\lambda = 517 \text{ nm}$; A_s - apsorbanacija ispitivanog uzorka pri $\lambda = 517 \text{ nm}$

3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

Priprema reagenasa:

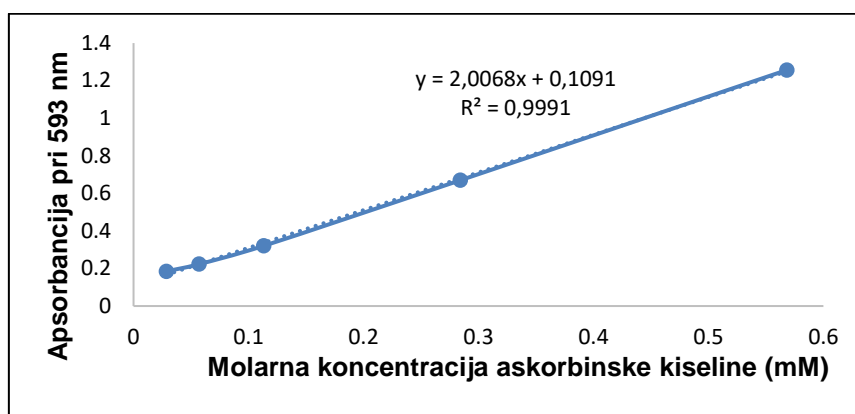
- otpipetirati 330 µl 37%-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu (100 mL) i nadopuniti destiliranom vodom kako bi se pripravila 40 mM otopina HCl
- 0,0312 g TPTZ prenese se u odmjernu tikvicu (10 mL) i nadopuni do oznake s 40 mM HCl kako bi se pripravila otopina TPTZ
- 0,541 g željezovog(III) klorid heksahidrata prenese se u tikvicu (100 mL) i nadopuni do oznake destiliranom vodom kako bi se pripravila otopina željezovog(III) klorid heksahidrata
- 3,1 g natrijevog acetata trihidrata prenese se u odmjernu tikvicu (1 L) u koju se doda 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni destiliranom vodom do oznake kako bi se pripravio acetatni pufer (0,3 M, pH = 3,6)
- miješanjem acetatnog pufera, TPTZ reagensa te otopine željezovog(III) klorid heksahidrata u omjeru 10:1:1 (25 mL+ 2,5 mL+ 2,5 mL) pripremljen je FRAP reagens

*Napomena: Prije početka rada sve reagense i standarde potrebno je inkubirati na 37 °C, 10 minuta

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripravi se otopina askorbinske kiseline (100 mg L^{-1}) od koje se odpipetira 0,5, 1, 2 i 5 mL u odmjernu tikvicu (10 mL) i do oznake nadopuni destiliranom vodom kako bi se priredile otopine koncentracije 5, 10, 20 i 50 mg L^{-1} . Potom se u staklene epruvete otpipetira 300 µl otopine standarda i 2250 µl FRAP reagensa, promiješa, termostatira 10

minuta na 37 °C, prenese u kivete i mjeri apsorbancija pri 593 nm (slika 13). Za slijepu probu koristi se 2550 µl destilirane vode.



Slika 13. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji askorbinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi :

$$y = 2,0068x + 0,1091$$

$$R^2 = 0,9991$$

Pri tome je : y = apsorbancija pri 593 nm

X= ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) izražen u mM

Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka:

U staklene epruvete otpipetira se 300 µl ekstrakta i 2250 µl FRAP reagensa, dobro promiješa, termostatira 10 minuta na 37 °C, prenese u kivete te mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje deionizirana voda. Ukoliko izmjerena apsorbancija prelazi vrijednost 1,0, ekstrakt je potrebno razrijediti kako bi apsorbancije bila između 0,1 i 0,9.

Budući da askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za redukciju željeza iz Fe²⁺ u Fe³⁺ je dovoljan samo jedan, antioksidacijski potencijal se računa pomoću izraza (Fegredo i sur., 2009):

$$\text{FRAP} = \text{Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja antioksidativnih svojstava ekstrakata biljke *Melissa officinalis* L. dobivenih metodom mikrovalne ekstrakcije. Parametri koji su se mijenjali tijekom ekstrakcije su temperatura (40 °C, 60 °C i 80 °C), vrijeme trajanja (5 i 10 min.) i polarnost otapala (voda i etanol te njihove smjese). Eksperimentalni podatci su obrađeni u MS Excel programu, te se uspoređene antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom i FRAP metodom.

4.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 3. Mjerenja su provedena u 3 paralele, a antioksidativna aktivnost odnosno % inhibicije DPPH je određivan kao što je opisano u 3.2.4.

Tablica 3. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata određena DPPH metodom (A, B i C označavaju temperaturu od 40 °C, 60 °C i 80 °C, 5 i 10 je vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama, a 30 %, 70 % i 96 % volumni udjeli etanola)

	A voda 5	B voda 5	C voda 5	A voda 10	B voda 10	C voda 10
% inhibicije DPPH	77,86	75,79	83,84	75,53	75,93	81,33
	77,55	75,94	83,89	75,11	75,19	82,48
	77,74	75,49	83,62	75,27	75,88	81,34
sr. vrij.	77,72	75,74	83,78	75,30	75,67	81,72
	A 30% 5	B 30% 5	C 30% 5	A 30% 10	B 30% 10	C 30% 10
% inhibicije DPPH	88,45	88,83	88,51	87,29	88,75	88,57
	88,29	87,79	87,88	86,78	89,06	89,40
	88,33	88,12	88,43	87,52	89,26	89,24
sr. vrij.	88,36	88,25	88,27	87,20	89,02	89,07
	A 70% 5	B 70% 5	C 70% 5	A 70% 10	B 70% 10	C 70% 10
% inhibicije DPPH	91,04	91,55	90,83	90,85	90,59	90,64
	90,43	91,32	90,90	90,63	90,19	90,32
	90,89	91,49	90,68	90,58	90,49	90,51
sr. vrij.	90,79	91,45	90,80	90,69	90,42	90,59

Tablica 3. Antioksidacijska aktivnosti ekstrakata određena DPPH metodom (A, B i C označavaju temperaturu od 40 °C, 60 °C i 80 °C, 5 i 10 je vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama, a 30 %, 70 % i 96 % volumni udjeli etanola) - *nastavak*

	A 96% 5	B 96% 5	C 96% 5	A 96% 10	B 96% 10	C 96% 10
%	40,88	48,11	71,30	47,28	64,57	80,39
inhibicije	40,26	49,90	67,96	46,13	62,52	78,59
DPPH	38,38	49,11	71,95	47,69	64,26	82,25
sr. vrij.	39,81	49,04	71,40	45,03	63,78	80,38

4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

U tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja antioksidativne aktivnosti ekstrakata FRAP metodom kao što je opisano u 3.2.5.

Tablica 4. Antioksidacijska aktivnosti ekstrakata izražena kao AAE u mM određena FRAP metodom (A, B i C označavaju temperaturu od 40 °C, 60 °C i 80 °C, 5 i 10 je vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama, a 30 %, 70 % i 96 % volumni udjeli etanola)

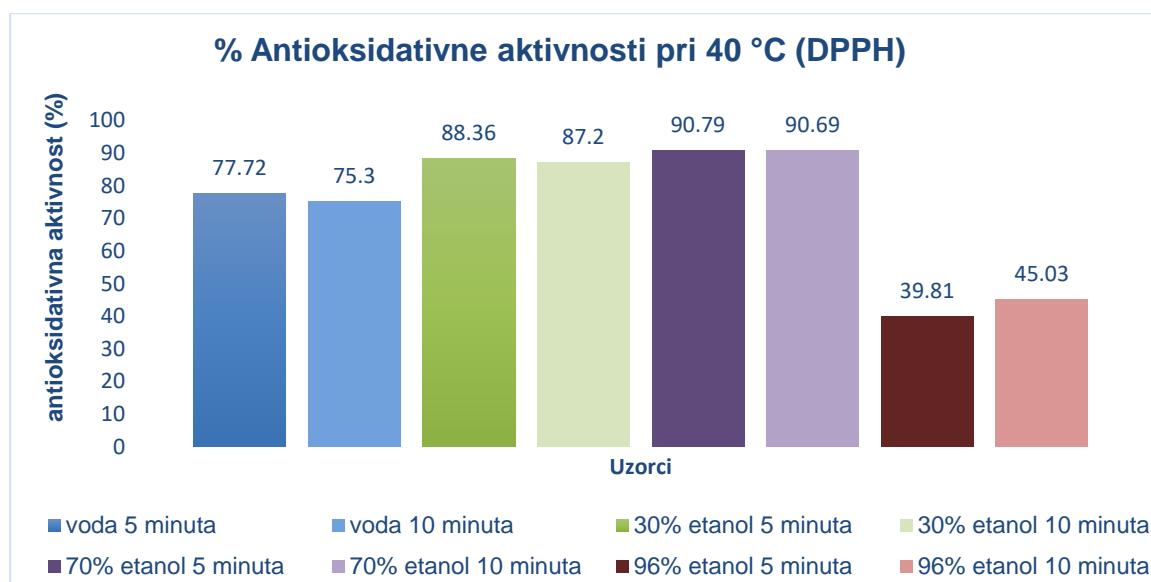
	A voda 5	B voda 5	C voda 5	A voda 10	B voda 10	C voda 10
FRAP	27,37	40,23	67,91	30,67	0,55	30,25
	26,44	39,13	76,44	31,75	3,26	44,59
	28,47	39,45	67,79	33,17	1,4	21,83
sr. vrij.	27,43	39,60	70,71	31,86	1,74	32,22
	A 30% 5	B 30% 5	C 30% 5	A 30% 10	B 30% 10	C 30% 10
FRAP	41,20	51,38	66,85	31,88	50,47	60,73
	41,73	56,97	66,16	34,75	48,71	59,47
	41,60	51,68	66,55	35,57	49,25	65,86
sr. vrij.	41,51	53,34	66,52	34,07	49,48	62,02
	A 70% 5	B 70% 5	C 70% 5	A 70% 10	B 70% 10	C 70% 10
FRAP	31,74	58,69	77,14	33,53	47,57	52,75
	34,84	50,75	56,83	38,26	48,78	57,13
	34,01	52,73	55,12	39,18	45,28	53,05
sr. vrij.	33,53	54,06	63,03	36,99	47,21	54,31

Tablica 4. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata izražena kao AAE u mM određena FRAP metodom (A, B i C označavaju temperaturu od 40 °C, 60 °C i 80 °C, 5 i 10 je vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama, a 30 %, 70 % i 96 % volumni udjeli etanola) - *nastavak*

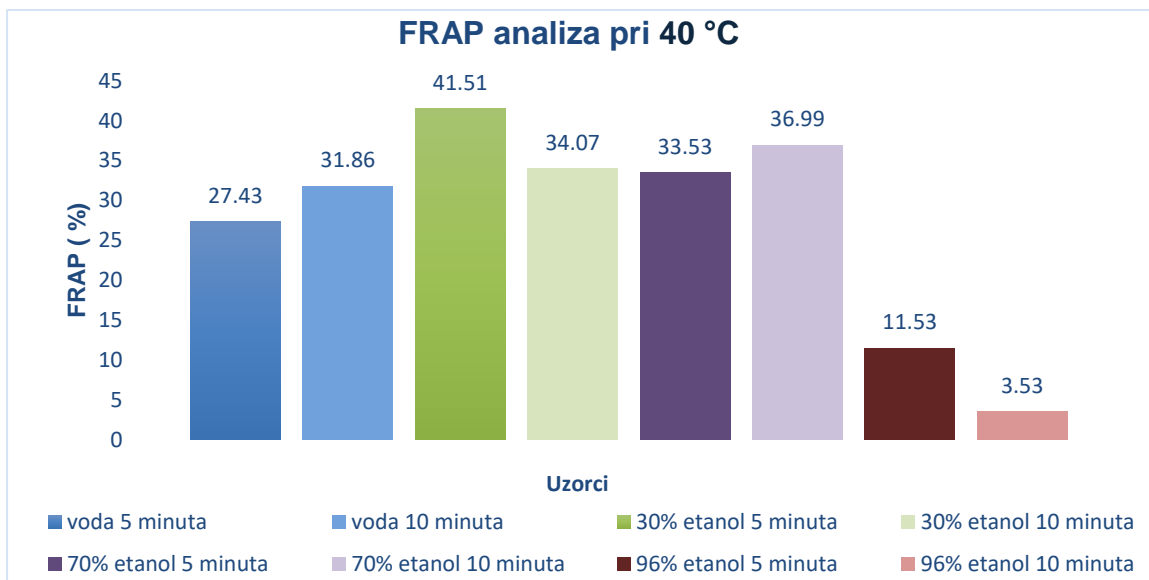
	A 96% 5	B 96% 5	C 96% 5	A 96% 10	B 96% 10	C 96% 10
FRAP	11,53	1,83	11,22	3,53	3,11	8,62
	0	1,79	9,36	0	1,65	9,85
	0	1,69	9,47	0	2,08	10,68
sr. vrij.	11,53	1,77	10,02	3,53	2,28	9,72

4.3. Grafički prikaz podataka

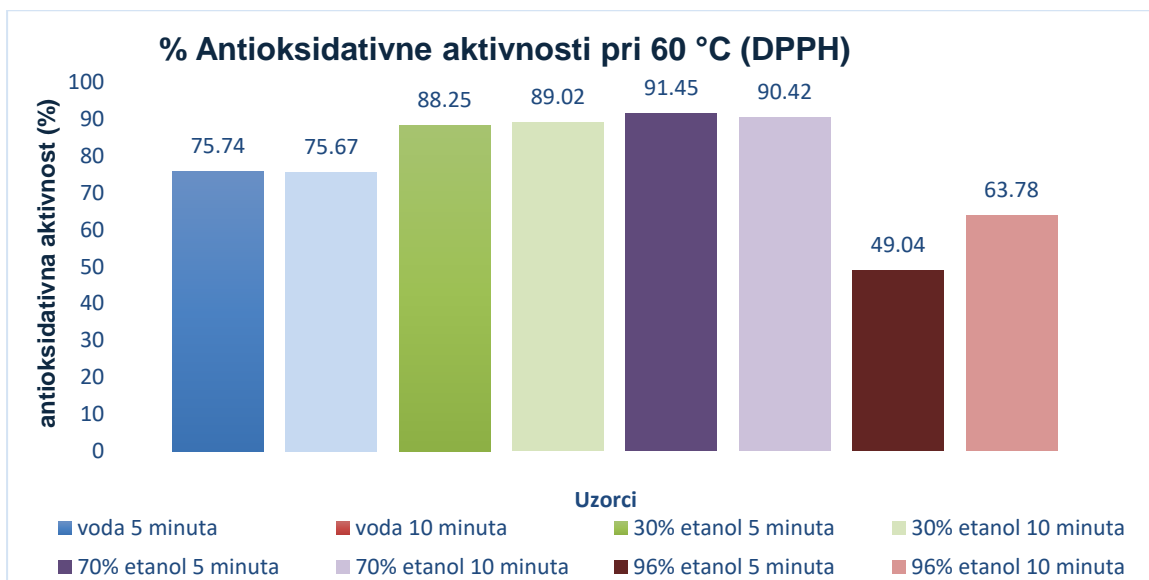
Kako bi se lakše korelirali ekstrakcijski parametri sa antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata, srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata određene DPPH i FRAP metodom prikazane su na dijagramima u nastavku.



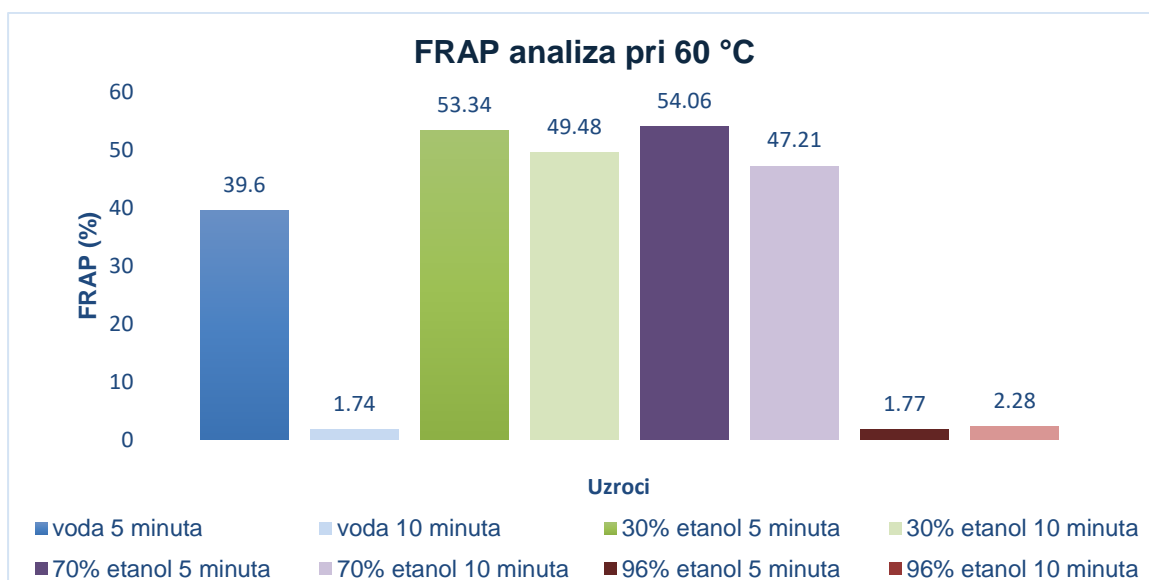
Slika 13. Grafički prikaz % inhibicije DPPH ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 40 °C.



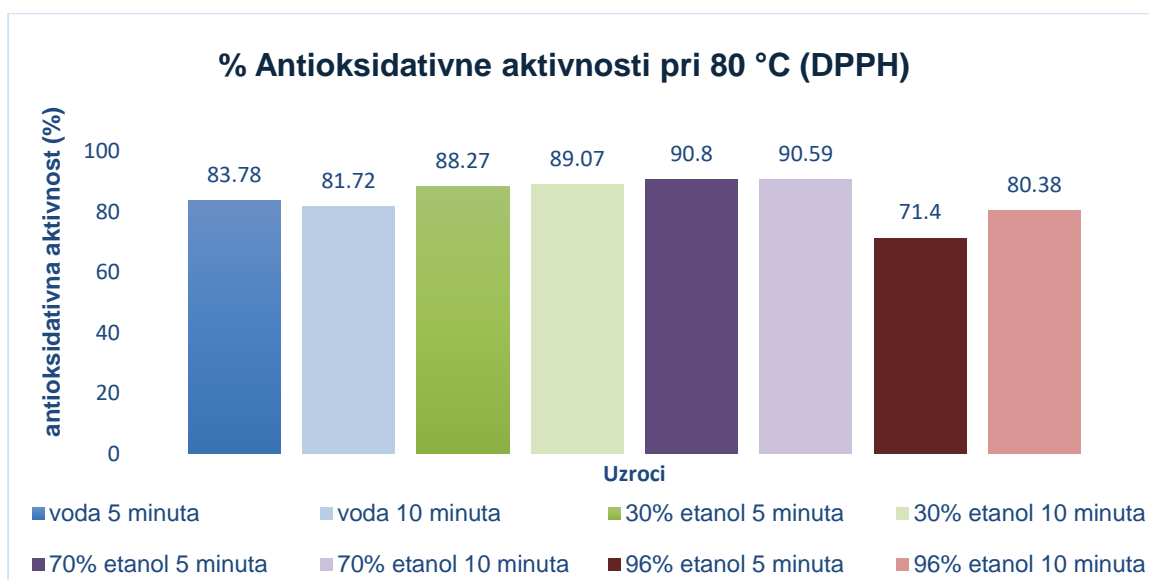
Slika 14. Grafički prikaz FRAP vrijednosti ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 40 °C.



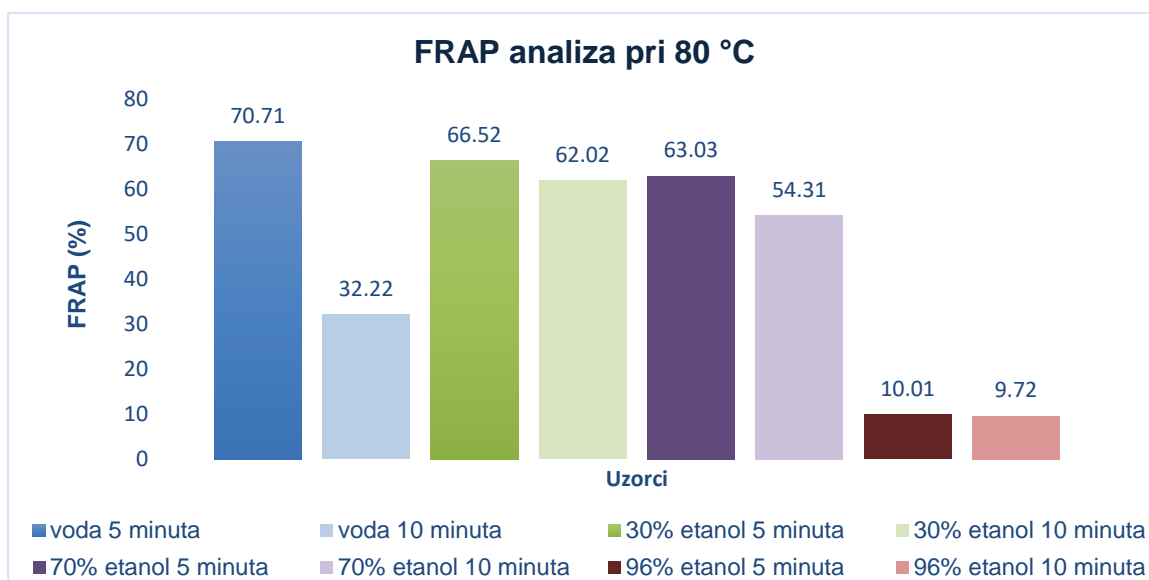
Slika 15. Grafički prikaz % inhibicije DPPH ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 60 °C.



Slika 16. Grafički prikaz FRAP vrijednosti ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 60 °C.



Slika 17. Grafički prikaz % inhibicije DPPH ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 80 °C.



Slika 18. Grafički prikaz FRAP vrijednosti ekstrakata dobivenih korištenjem različitih otapala, uz različito vrijeme ekstrakcije pri 80 °C.

Postotak inhibicije DPPH radikala kreće se u rasponu 39,81% do 91,45%, a pritom najveći postotak inhibicije (~90%) pokazuju uzorci ekstrahirani 70%-tnom vodenom otopinom etanola, bez obzira na temperaturu provođenja MAE. Neznatno slabija inhibicijska aktivnost opažena je kod uzoraka ekstrahiranih 30%-tnim etanolom, približno 89% pri svim temperaturama. Korištenje vode kao otapala za ekstrakciju rezultiralo je nešto slabijim postotkom inhibicije DPPH radikala, u rasponu od ~75% do ~84%, ovisno o temperaturi ekstrakcije. Najmanji antioksidacijski kapacitet pokazali su uzorci ekstrahirani 96%-tnim etanolom, 40% do 80%. Također, vrijeme trajanja MEA tretmana ne utječe značajno na postotak inhibicije DPPH radikala. FRAP analiza kao i u slučaju DPPH metode ukazuje kako u gotovo svim mjerenjima i pri svim temperaturama pri kojima je MAE provedena najveći antioksidacijski potencijal imaju uzorci ekstrahirani 30%-tnim i 70%-tnim etanolom, od ~33 do ~66 AAE. Iznimno, opažena je visoka antioksidacijska aktivnost uzorka ekstrahiranog vodom pri 80 °C, tijekom 5 minuta (70 AAE). Uzorci ekstrahirani 96%-tnim etanolom pokazuju najmanji antioksidacijski kapacitet što je u skladu s rezultatima DPPH analize. Za razliku od % inhibicije DPPH radikala, redukcijska moć uzoraka značajno ovisi o trajanju MAE tretmana.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja i provedene rasprave zaključci su sljedeći:

1. Pri određivanju antioksidativne aktivnosti DPPH metodom uzoraka dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom pri 40 °C, 60 °C i 80 °C najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju oni ekstrahirani 70%-tnim etanolom, a nešto manju oni gdje je kao otapalo korišten 30%-tni etanol.
2. Trajanje ekstrakcije (5 i 10 minuta) nije znatno utjecalo na antioksidacijski potencijal uzoraka ekstrahiranih vodom te 30% i 70%-tnim etanolom, a najveće razlike se očitavaju kod uzoraka otopljenih u 96% etanolu.
3. Pri određivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata FRAP metodom dobiveni rezultati nisu, kao u slučaju DPPH, homogeni pri svim temperaturama.
4. Za uzorke koji su tretirani pri 40 °C, najbolje FRAP rezultate pokazuju oni ekstrahirani 30%-tnim etanolom, a trajanje ekstrakcije najviše je utjecalo na one ekstrahirane 96%-tnim etanolom.
5. Kod uzoraka tretiranih pri 60 °C najveću FRAP aktivnosti pokazuju oni ekstrahirani 30% i 70%-tnim etanolom, a trajanje ekstrakcije je najviše utjecalo na uzorke otopljene u vodi.
6. Kod uzoraka tretiranih pri 80 °C, najveću FRAP aktivnost pokazuju oni ekstrahirani vodom tijekom 5 minuta. Najveći utjecaj vremena registriran je kod upotrebe vode kao otapala za ekstrakciju.
7. Opažene su očekivane razlike u antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka jer prinosi antioksidansa u ekstraktima ovise o trajanju i temperaturi ekstrakcije te korištenom otapalu.
8. Rezultati DPPH i FRAP analize razlikuju se stoga što se metode temelje na različitim mehanizmima.

6. POPIS LITERATURE

Benzie I, Strain J (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Anal Biochem* **239**, 70-76.

<http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Neral B, Šostar Turk S, Schneider R (2007) Efikasnost mikrovalnog fiksiranja reaktivnog bojila C. I. Reactive Red 24 u digitalnom tisku pamučnih tkanina. *Tekstil* **56**, 358-367.,

<https://hrcak.srce.hr/22849>. Pristupljeno 20. svibnja 2024.

Ballard ST, Malakarjunan P, Zhou K, O'Keffe S (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem* **120**, 1185-1192.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>

Chimactiv - Interactive numerical educational resources for the analysis of complex media (2024), <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>

Pristupljeno 12. svibnja 2024.

Destandau E, Michel T, Elfakir C (2013) Microwave - assisted Extraction, U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno MA, Prado JM, ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113-135.

<https://doi.org/10.1039/9781849737579-fp001>

Farcas AC, Socaci SA, Nemes SA, Salanta LC, Chis MS, Pop Farcas CR, i sur. (2022) Cereal Waste Valorization through Conventional and Current Extraction Techniques—An Up-to-Date Overview. *Foods* **11**, 2454. <https://doi.org/10.3390/foods11162454>

Gulcin I, Alwasel SH (2023) DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* **11**, 2248.

<https://doi.org/10.3390/pr11082248>

Helmenstine A (2024) Electromagnetic Spectrum Definition and Explanation

<https://sciencenotes.org/electromagnetic-spectrum-definition-and-explanation/>

Pristupljeno 9. svibnja 2024.

Hemwimon S, Pavasant P, Shotipruk A (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep Purif Technol* **54**, 44-50.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.08.014>

Kaufmann B, Christen P (2002) Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochem Anal* **13**, 105-113.

<https://doi.org/10.1002/pca.631>

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

<https://www.phcogrev.com/>

Fegredo JA, Wong MCY, Wiseman H, Preedy VR, (2009) Chapter 97 - Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers. U: Preedy VR (ured.), *Beer in Health and Disease Prevention*, Academic Press, San Diego, str. 991-1002.

Petrisor G, Motelica L, Craciun LN, Oprea OC, Fikai D, Fikai A (2022) *Melissa officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. *Int J Mol Sci* **23**, 3591. <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>

Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of Antioxidant Activity. *J Funct Foods* **18**, 757-781.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

Spar Eskilsson S, Bjorklund E (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chrom A* **902**, 227–250. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00921-3)

Starmans DAJ, Nijhuis HH (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends Food Sci Technol* **7**, 191-197. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10020-0](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10020-0)

Wang L, Weller CL (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants.

Trends Food Sci Technol **17**, 300-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

Zhong Y, Shahidi F (2015) Methods for the assessment of antioxidant activity in food. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287–333. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-089-7.00012-9>.

Zrinski I, Eckert-Maksić M (2005). Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi. *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske* **54**, 469-476.

Izjava o izvornosti

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



Vlastoručni potpis