

Antioksidacijski potencijal ekstrakata raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Granić, Glorija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:248325>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL EKSTRAKATA
RAŠTIKE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

DIPLOMSKI RAD

GLORIJA GRANIĆ

Matični broj: 12

Split, rujan, 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL EKSTRAKATA
RAŠTIKE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

DIPLOMSKI RAD

GLORIJA GRANIĆ

Matični broj: 12

Split, rujan, 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF KALE
(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) EXTRACTS

DIPLOMA THESIS

GLORIJA GRANIĆ

Parent number: 12

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL EKSTRAKATA RAŠTIKE (*Brassica oleracea L. var. acephala*)
Glorija Granić, 12

Sažetak:

Raštika (*Brassica oleracea L. var. acephala*) je autohtona hrvatska povrtna kultura, osobito popularna u južnom priobalju Dalmacije i susjedne Bosne i Hercegovine ali nažalost vrlo malo istražena. Razvojem znanosti i projektima koji se oslanjaju na popularizaciju autohtonih kultura, raštika danas postaje sve češće predmetom istraživanja zbog svog bogatog nutritivnog sastava i biološkog učinka na ljudsko zdravlje. U ovom radu ispitana je primjena različitih metoda ekstrakcije (ultrazvuk - UZV i mikrovalna - MAE), kao i otapala (voda i 50 %-tni etanol), na prinos ukupnih fenola u ekstraktima raštike s područja Hercegovine. Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost ispitana je različitim metodama, ovisno o mehanizmu djelovanja: FRAP (*Ferric-reducing antioxidant power*), DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*) i ORAC (*Oxygen radical absorbing capacity*). Dobiveni rezultati ukazuju na bogatiji fenolni sastav ekstrakata pripremljenih korištenjem vode kao otapala kod obje metode ekstrakcije, UZV i MAE (250-270 mg GAE/L). Uspoređujući metode ekstrakcije istaknula se MAE metoda koja je u puno kraćem vremenu dala gotovo sličan prinos fenolnih komponenti u odnosu na UZV. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom bila je najbolja u vodenim ekstraktima, dok se kod ORAC i DPPH metode uočavaju velike razlike u antioksidacijskoj aktivnosti osobito kod etanolnih uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom i mikrovalovima. Dobiveni rezultati se nedvojbeno razlikuju, no svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobar antioksidacijski potencijal i udio ukupnih fenola. Uzimajući u obzir da su razlike u rezultatima fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka vrlo male, kao najpovoljnija metoda ekstrakcije odabrana je mikrovalna upravo zbog kraćeg vremena provedbe ekstrakcije.

Ključne riječi: raštika, ukupni fenoli, antioksidacija, DPPH, ORAC, FRAP, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 37 stranica, 13 slika, 8 tablica, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović, član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza, mentor

Datum obrane: 18. rujna 2020. g.

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Food technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 28

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Technical assistance: mag. chem. Azra Đulović

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF KALE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) EXTRACTS Glorija Granić, 12

Abstract:

Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is an autochthonous Croatian vegetable culture, especially popular in the southern coast of Dalmatia and neighboring Bosnia and Herzegovina, but unfortunately poorly researched. With the development of science and projects that rely on the popularization of indigenous cultures, raštika is now increasingly the subject of research due to its rich nutritional composition and biological effect on human health. In this paper, the application of different extraction methods (ultrasound - UZV and microwave - MAE), as well as solvents (water and 50% ethanol), on the yield of total phenols in extracts of kale from the territory of Herzegovina. The proportion of total phenols was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method and antioxidant activity was tested with different methods, depending on the mechanism of action: FRAP (Ferric-reducing antioxidant power), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) and ORAC (Oxygen radical absorbing capacity). The obtained results indicate an abundant phenolic composition of extracts prepared using water as solvent in both extraction methods, ultrasound and MAE (250-270 mg GAE/L). Comparing the extraction methods, MAE method stood out, which in a much shorter time gave almost similar yields of phenolic components compared to ultrasound. The antioxidant activity determined by the FRAP method was the best in aqueous extracts, while the ORAC and DPPH methods showed large differences in antioxidant activity, especially in ethanol samples extracted by ultrasound and microwaves. The obtained results undoubtedly differ, but all tested samples show extremely good antioxidant potential and total phenolic contents. Considering that the differences in the results of phenolic composition and antioxidant activity of the tested samples was very small, the microwave was chosen as the most appropriate extraction method because of the shorter duration of extraction.

Key words: kale, total phenols, antioxidantation, DPPH, ORAC, FRAP, MAE

Thesis contains: 37 pages, 13 figures, 8 tables, 40 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivica Blažević, Associate Professor, chair person
2. Ph. D. Zvonimir Marijanović, Assistant Professor, member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor, supervisor

Defence date: September 18, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroze, u razdoblju od veljače do rujna 2020. godine.

Ovaj rad financiran je od projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2016-06-1316.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na svojoj pomoći koju mi je pružila prilikom realizacije ovog rada ali i za svu potporu tokom studija.

Osobito se zahvaljujem svojim roditeljima na povjerenju i bezuvjetnoj podršci tijekom proteklih pet godina. Zahvaljujem se i svojim curama koje su u studentske dane donijele prijateljstvo i radost. Ivane, hvala ti što si bio motivacija i oslonac.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Pripraviti ekstrakte raštike s područja Hercegovine primjenom različitih metoda ekstrakcije (ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija) i otapala (voda i etanol).
- U ekstraktima odrediti udio ukupnih fenola i ispitati antioksidacijsku aktivnost vodenih i alkoholnih ekstrakata raštike korištenjem tri različite metode: FRAP (*Ferric-reducing antioxidant power*), DPPH (*2,2,-Diphenyl 1-picrylhydrazyl assay*) i ORAC (*Oxygen radical absorbing capacity*).
- Dobivene rezultate usporediti i donijeti zaključak o najpovoljnijim uvjetima ekstrakcije obzirom na udio ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal ekstrakata raštike.

SAŽETAK

Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) je autohtona hrvatska povrtna kultura, osobito popularna u južnom priobalju Dalmacije i susjedne Bosne i Hercegovine ali nažalost vrlo malo istražena. Razvojem znanosti i projektima koji se oslanjaju na popularizaciju autohtonih kultura, raštika danas postaje sve češće predmetom istraživanja zbog svog bogatog nutritivnog sastava i biološkog učinka na ljudsko zdravlje. U ovom radu ispitana je primjena različitih metoda ekstrakcije (ultrazvuk - UZV i mikrovalna - MAE), kao i otapala (voda i 50 %-tni etanol), na prinos ukupnih fenola u ekstraktima raštike s područja Hercegovine. Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. Antioksidacijska aktivnost ispitana je različitim metodama, ovisno o mehanizmu djelovanja: FRAP (Ferric-reducing antioxidant power), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) i ORAC (Oxygen radical absorbing capacity). Dobiveni rezultati ukazuju na bogatiji fenolni sastav ekstrakata pripremljenih korištenjem vode kao otapala kod obje metode ekstrakcije, UZV i MAE (250-270 mg GAE/L). Uspoređujući metode ekstrakcije istaknula se MAE metoda koja je u puno kraćem vremenu dala gotovo sličan prinos fenolnih komponenti u odnosu na UZV. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom bila je najbolja u vodenim ekstraktima, dok se kod ORAC i DPPH metode uočavaju veliku razlike u antioksidacijskoj aktivnosti osobito kod etanolnih uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom i mikrovalovima. Dobiveni rezultati se nedvojbeno razlikuju, no svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobar antioksidacijski potencijal i udio ukupnih fenola. Uzimajući u obzir da su razlike u rezultatima fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka vrlo male, kao najpovoljnija metoda ekstrakcije odabrana je mikrovalna upravo zbog kraćeg vremena provedbe ekstrakcije.

Ključne riječi: raštika, ukupni fenoli, antioksidacija, DPPH, ORAC, FRAP, mikrovalna ekstrakcija

SUMMARY

Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is an autochthonous Croatian vegetable culture, especially popular in the southern coast of Dalmatia and neighboring Bosnia and Herzegovina, but unfortunately poorly researched. With the development of science and projects that rely on the popularization of indigenous cultures, raštika is now increasingly the subject of research due to its rich nutritional composition and biological effect on human health. In this paper, the application of different extraction methods (ultrasound - UZV and microwave - MAE), as well as solvents (water and 50% ethanol), on the yield of total phenols in extracts of kale from the territory of Herzegovina. The proportion of total phenols was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method and antioxidant activity was tested with different methods, depending on the mechanism of action: FRAP (Ferric-reducing antioxidant power), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) and ORAC (Oxygen radical absorbing capacity). The obtained results indicate an abundant phenolic composition of extracts prepared using water as solvent in both extraction methods, ultrasound and MAE (250-270 mg GAE/L). Comparing the extraction methods, MAE method stood out, which in a much shorter time gave almost similar yields of phenolic components compared to ultrasound. The antioxidant activity determined by the FRAP method was the best in aqueous extracts, while the ORAC and DPPH methods showed large differences in antioxidant activity, especially in ethanol samples extracted by ultrasound and microwaves. The obtained results undoubtedly differ, but all tested samples show extremely good antioxidant potential and total phenolic contents. Considering that the differences in the results of phenolic composition and antioxidant activity of the tested samples was very small, the microwave was chosen as the most appropriate extraction method because of the shorter duration of extraction.

Key words: kale, total phenols, antioxidation, DPPH, ORAC, FRAP, MAE

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. KUPUSNJAČE (porodica Brassicaceae).....	2
1.1.1. ROD <i>Brassica</i>	3
1.2. RAŠTIKA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>).....	5
1.2.1. IZGLED RAŠTIKE.....	8
1.2.2. UZGOJ RAŠTIKE.....	9
1.2.3. NUTRITIVNA VRIJEDNOST I KEMIJSKI SASTAV RAŠTIKE.....	9
1.3. FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA RAŠTIKE.....	12
1.3.1. ANTIOKSIDANSI I MEHANIZMI DJELOVANJA.....	14
1.4. EKSTRAKCIJA.....	15
1.4.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA (UZV).....	16
1.4.1.1. UTJECAJ POJEDINIH PARAMETARA NA UZV EKSTRAKCIJU.....	17
1.4.2. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	18
1.4.2.1. UTJECAJ POJEDINIH PARAMETARA NA MIKROVALNU EKSTRAKCIJU.....	19
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
2.1. BILJNI MATERIJAL.....	21
2.2. UREĐAJI.....	21
2.3. KEMIJSKE TVARI.....	21
2.4. METODE EKSTRAKCIJE.....	22
2.4.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA.....	23
2.4.2. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	23
2.5. METODE ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA.....	25
2.6. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	25
2.6.1. FRAP.....	25
2.6.2. ORAC.....	26
2.6.3. DPPH.....	27

3. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
3.1.REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA.....	29
3.2.REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	31
4. ZAKLJUČAK.....	34
5. LITERATURA.....	35

UVOD

Naši preci su još u prapovijesti bili svjesni „funkcionalnosti“ hrane i dobiti određenih vrsta namirnica na ljudsko zdravlje. Vremenom su se te značajke potisnule i hrana je ispunjavala samo primarnu ulogu, utaživanje gladi i pružanje hranjivih sastojaka. Međutim, rapidnim razvojem znanosti posljednjih nekoliko desetljeća, pojavljuje se sve veći broj dokaza da hrana i određene komponente hrane značajno utječu na zdravlje i dobrobit ljudi. Time se uvelike mijenja i percepcija potrošača i javlja se trend takozvane funkcionalne hrane. Takva hrana, za koju postoje brojna utemeljena znanstvena istraživanja, izravno pridonosi boljem zdravstvenom stanju, smanjuje rizik od nekih bolesti i/ili se koristi za liječenje određenih bolesti. Cijeli taj koncept slijedi dobro poznatu i davno opravdanu Hipokratovu izjavu „Neka hrana bude tvoj lijek i lijek neka bude tvoja hrana“.

Skupina kupusnjača se zbog visokovrijednog udjela fitokemikalija odnosno fitonutrijenata ubraja u funkcionalnu hranu i svojim djelovanjem potvrđuje navedenu izjavu. Osim što se tradicionalno uzgaja u području Mediterana, posebno popularna postaje i u Sjevernoj Americi. Razlog tomu je visoka tolerantnost na ekstremne temperaturne promjene tokom godine zbog čega se poljoprivrednici sve češće okreću uzgoju vrsta iz skupine kupusnjača. Jedna od najstarijih vrsta iz porodice kupusnjača je raštika (*Brassica oleracea L. var. acephala*). Njena upotreba datira još od 2 000 godina prije naše ere a smatra se da potječe iz istočnog Mediterana. Uzgaja se na malim proizvodnim površinama, u vrtovima i okućnicama i to najčešće iz vlastite sjemenske produkcije. U Hrvatskoj je poznata i po lokalnim nazivima kao što su „rašćika“, „štalar“, „brački kupus“ i drugi. Znanstvenim istraživanjima koja su posljednjih godina pokazala pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje, zahvaljujući bioaktivnim komponentama, smatra se funkcionalnom hranom i sve češće postaje zanimljiva potrošačima.

U ovom radu ispitivani su vodeni i alkoholni ekstrakti vlastito uzgojene raštike (*Brassica oleracea L. var. acephala*) na području Hercegovine. Provedene su dvije različite metode ekstrakcije, ultrazvučna i mikrovalna. Ekstraktima je mjereno udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost metodama FRAP, DPPH i ORAC.

1. OPĆI DIO

1.1. Kupusnjače (porodica Brassicaceae)

Kupusnjače ili krstašice velika su biljna porodica i to s nutritivnog i ekonomskog značaja. Raširene su po svim naseljenim kontinentima, a posebno prevladavaju u području Europe i Sjeverne Amerike. U redu Brassicales izdvaja se ukupno 7 887 vrsta, a sedam najuzgajanijih vrsta su: *Alliaria* (*Alliaria petiolata*), *Brassica* (*Brassica elongata* i *Brassica tournefortii*), *Cardamine* (*Cardamineflexuosa* i *Cardamineglacialis*) i *Lepidium* (*Lepidium latifolium* i *Lepidium virginicum*). (1)

U porodicu kupusnjača spada veliki broj povrćarki čiji se različiti biljni dijelovi svakodnevno koriste za ishranu. Sve vrste se pojedinačno ističu velikom raznolikošću u morfologiji vegetativnih dijelova ali ih povezuje izrazita sličnost reproduktivnih organa. Većina ovih biljnih vrsta su dvogodišnje, osim kineskog i pekinškog kupusa i brokule, ranih sorti cvjetače, brokule i korabice koje su jednogodišnje. Građa cvijeta, cvata, ploda, sjemena i kotiledonih listića je ista. Sjeme kupusnjača je toliko slično da razlike nisu vidljive golim okom. Uočljive su isključivo mikroskopskim promatranjem i to u građi sjemenjače. Prve jasne razlike nastaju tek pojavom prvog pravog lista, a rastom vegetativnih organa one postaju sve značajnije i najveće su u fazi tehnološke zrelosti. Što se tiče morfoloških karakteristika spadaju u dikotiledonske biljke koje niču sa dva bubrežasta srcolika klicina listića, zelene boje i hipokotiledonske sa slabijom ili izraženijom ljubičastom bojom. (1)

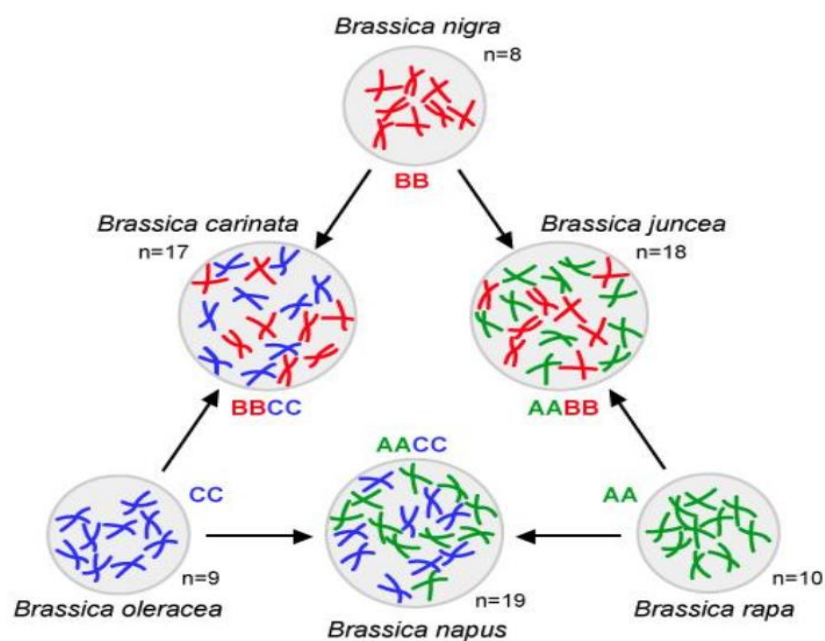
Zbog klimatske i zemljišne raznolikosti u Hrvatskoj je jako duga tradicija uzgoja povrća što je razlog prisutnosti velikog broja sorti od kojih su mnoge toliko ukorijenjene u autohtonu agronomiju i gastronomiju hrvatskog dijela Mediterana da su neke dobile i Zaštićenu oznaku izvornosti poput Ogulinskog zelja/ kupusa. Migracijama ljudi dolazilo je i do razmjene sjemena različitih povrtnih kultura. Međutim, samo ono koje se najbolje prilagodilo lokalnim uvjetima, davalo je dobre prinose i ostalo je tu do danas. Iz porodice kupusnjača najveći značaj za ljudsku prehranu imaju vrste koje su se razvile iz divljeg kupusa, *Brassica oleracea*, a njihova popularnost bila je izrazita u malim obiteljskim gospodarstvima ruralnih dijelova Hrvatske. Međutim, sve veća komercijalizacija proizvodnje povrća s vremenom je dovela do nestajanja takvih malih gospodarstava što je bilo pokretač depopulacije ruralnih prostora zbog čega je biološka raznolikost povrtnih kultura izrazito ugrožena sve do danas. (2) Tomu doprinose i okolišne promjene poput ekstremnih temperatura, suše ili povišenog saliniteta tla posljednjih

nekoliko desetljeća. Posljedica svih tih negativnih utjecaja je značajno smanjenje prinosa poljoprivrednih usjeva. Rješenje takvim problemima nameće se iz Fondova Europske unije za poticanje razvoja ruralnog gospodarstva na što se domaći poljoprivrednici, između ostalog, potiču na uzgoj i očuvanje autohtonih vrsta poput kupusa, lisnatog kelja i raštike. (3)

1.1.1. Rod *Brassica*

Rod *Brassica* jedan je od najvažnijih rodova porodice kupusnjača a u njega se ubrajaju mnoge poznate poljoprivredne vrste poput repice, gorušice, kupusa i brokule koji imaju dugu tradiciju kultivacije u ljudskoj povijesti. Tome svjedoče i zapisi na sanskrtu koji navode uporabu kupusnjača roda *Brassica* čak 3 000 g. prije naše ere. (4)

Podrijetlo šest najvažnijih *Brassica* vrsta (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. carinata* i *B. juncea*) najjednostavnije se objašnjava teorijom *U trokuta* prikazanom na Slici 1. Tom teorijom, utemeljenom još 1935. g., genomi navedenih vrsta podijeljeni su na tri glavna genoma (A, B i C) koji su organizirani kao diploidi (AA, BB i CC) i alotetraploidi (AABB, AACC i BBCC). Diploidni genomi sve tri vrste postoje zasebno kao genom A (*B. rapa*, AA, $2n = 20$), genom B (*B. nigra*, BB, $2n = 16$) i genom C (*B. oleracea*, CC, $2n = 18$) koji se nalaze na vrhovima trokuta Slike 1., no budući da su usko povezani podrijetlom moguće je njihovo međusobno križanje. Prirodnom hibridizacijom tako su nastale nove vrste. (4)



Slika 1. Odnosi među vrstama roda *Brassica* prema teoriji *U trokuta* (4)

Sve kupusnjače pripadaju porodici Brassicaceae, rod *Brassica*, vrsta *Brassica oleracea* a u njih ubrajamo glavičasti kupus, lisnati kelj (raštan, raštika), kelj glavičar, kelj pupčar, cvjetača, brokula, kineski i pekinški kupus, i korabica. Zajedničke karakteristike su im otpornost prema mrazu i dobro uspijevanje na tlu pognojenom organskim gnojivima. (1) Literaturni nazivi s latinskim imenima svih kupusnjača prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Vrste *Brassica oleracea* (1)

Literaturni naziv	Latinski naziv (vrste i podvrste)
KUPUS	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata forma alba i rubra</i>
KELJ	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Sabauda</i>
LISNATI KELJ (RAŠTAN, RAŠTIKA)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>
KELJ PUPČAR	<i>Brassica oleracea</i>
CVJETAČA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>
BROKULA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> , sub-var. <i>cymosa</i> , subvar. <i>Italica</i>
KINESKI KUPUS	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>chinensis</i>
PEKINŠKI KUPUS	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>pekinensis</i>
KORABICA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>

Uvjeti uspijevanja svih navedenih kupusnjača su vrlo slični i karakteriziraju ih slični zahtjevi za rast i razvoj:

- **Temperatura** - Kupusnjače su relativno otporne na niske temperature. Optimalna temperatura za rast je od 17–20 °C, a visoke temperature preko 25 °C usporavaju rast.
- **Svjetlost** – Kupusnjače su biljke dugog dana i imaju umjerene zahtjeve prema svjetlosti. Najveći zahtjevi za svjetlošću su u prvim fazama rasta i razvoja.
- **Voda** - Kupusnjače spadaju u vrste sa visokim zahtjevima za vodom. Nedostatak vlage u tlu zaustavlja rast kupusnjača, ali i prevelika količina vode također djeluje nepovoljno.
- **Tlo** - srednja teška tla sa dobrim zračnim i vodnim svojstvima, uz dovoljno hranjivih tvari, najpovoljnija su za uzgoj kupusnjača. Vrlo dobro reagiraju na organska gnojiva. Kupusnjače dobro uspijevaju na tlima sa velikom količinom podzemne vode, ali ne podnose terene sa puno površinske vode. Također, ne uspijevaju na kiselim tlima, a za uspješnu proizvodnju najpovoljnija su neutralna tla. (1)

1.2. Raštika (*Brassica oleracea var. acephala*)

Do nazad nekoliko godina brokula je bila najpopularnija vrsta iz porodice kupusnjača, zahvaljujući intenzivnim znanstvenim istraživanjima biološki aktivnih komponenti brokule i njenih pozitivnih utjecaja na zdravlje. Međutim, orijentacijom znanosti na detaljnija proučavanja ostalih vrsta kupusnjača, lisnati kelj/ raštika (*Brassica oleracea var. acephala*) postaje sve popularnija među predstavnicima porodice kupusnjača. U prilog tome ide i činjenica da se u SAD-u svake godine u listopadu slavi Dan raštike, engl. *National kale day*. Intenzivna promocija među potrošačima koja raštiku klasificira kao funkcionalnu hranu, dovela ju je do jelovnika mnogih restorana širom SAD-a, posebno onih orijentiranih na zdravu prehranu. Na području Republike Hrvatske također se tradicionalno održavaju "Raštikijade" i slične manifestacije. Postoji puno različitih vrsta *raštike*, a zajedničko svakoj formi jest da je vršni pup u vegetativnoj fazi otvoren i aktivan tj. ne tvori glavu, glavicu kupusa. Botaničari su ih svrstali u različite podvrste, a najprihvatljivija je podjela prema Pignattiju u dvije forme:

- *f. viridis*, glatkog lišća, koja se u nas najčešće zove raštika i
- *f. sabellica*, mjehurastog ili kovrčavog lišća koje se zove lisnati kelj. (1)

Jedino što ih razlikuje je upravo taj izgled lista.

Listovi se obično samo blanširaju ili se čak koriste svježi u salatama s umacima a dužom termičkom obradom kuhaju se raznovrsna jela poput juha, variva, toplih predjela i sl. U Europi pa tako i u Hrvatskoj, raštika se češće poslužuje tradicionalno uz dimljenu svinjetinu, kao varivo. (5) Lišće raštike/lisnatog kelja najviše se koristi kuhano na lešo ili zajedno s drugim povrćem, krumpirom, bobom, slanutkom i slično te čini vrlo ukusan prilog jelima od mesa. Mljeveno meso s rižom umotano u lišće raštike, kuhano i začinjeno kiselim mlijekom ili vrhnjem naziva se „japrak“ i popularno je u Hercegovini. (1) Posljednjih nekoliko godina jača trend sušenog povrća i proizvodnje tzv. „zdravog čipsa“ pa se tako procesom sušenja listova raštike na tržište stavlja i čips od raštike. (5)

Na priobalnom području Dalmacije, Dalmatinske zagore, Istre i otoka raštika se tradicionalno uzgaja kao povrtna kultura već dugi niz godina. (6) Duboko je ukorijenjena u tradicionalnu gastronomiju navedenih dijelova Hrvatske dok se stariji listovi raštike koriste kao hrana domaćim životinjama. (6) Među hrvatskim populacijama raštike prevladava intrapopulacijska i interpopulacijska varijabilnost. Intrapopulacijska varijabilnost je rezultat međusobnog križanja s ostalim *Brassica* vrstama, a uzrokovana je slabom izolacijom pri sjemenskoj

proizvodnji. Interpopulacijska varijabilnost posljedica je selekcije od strane poljoprivrednika te genetske adaptacije. (7) Problem uzgoja raštike je što ona nije ekonomski značajno povrće, nema selekcioniranih vrsta i sjeme se ne može pronaći u trgovinama. Kao ekstenzivna vrsta uzgaja se na malim proizvodnim površinama, u vrtovima i okućnicama i to najčešće vlastito uzgojenim sjemenom (Slika 2.), što znači da se sjeme čuva i ponovno koristi a to je zasigurno razlog i velike biološke raznolikosti. (2)



Slika 2. Vlastiti uzgoj sjemena raštike na malom obiteljskom gospodarstvu (8)

Razvojem znanosti u Hrvatskoj je posljednjih godina provedeno nekoliko projekata istraživanja i očuvanja autohtonih povrtnih kultura među kojima je i projekt Z. Matotana iz 2007. u kojemu je raštika s ovih područja bila uključena u projekt prikupljanja, morfološke karakterizacije i regeneracije lokalnih ekopopulacija raštike u svrhu zaštite i očuvanja starih sorti povrća. (9)



Slika 3. Odrasla biljka raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (10)

Zdravstvena dobrobit se kod svih povrćarki iz roda *Brassica*, pa tako i u raštici, pripisuje prisutnosti fitonutrijenata iz skupine glukozinolata, polifenola, karotenoida ili terpenoida. Istražujući zapise o tradicionalnoj medicini zapaženo je da se ista riječ koristila za sve lisnato povrće *Brassice*, pa je teško razlikovati kada se u tradicionalnoj medicini koristio kupus (*capitata* skupina) a kada kelj (*acefalna* skupina). Međutim, time možemo zaključiti kako je upotreba raštike u tradicionalnoj medicini slična kao i upotreba drugih kultura iz roda *Brassica* koje se stoljećima koriste za liječenje gastritisa i čira na želudcu. Osim ublažavanja simptoma želučanog ulkusa, raštika se koristi za liječenje dijabetesa melitusa, reumatizma, slabosti kostiju, bolesti jetre, anemije, pretilost itd. (5)

1.2.1. Izgled raštike

Gledajući od podnožja prema vrhu, usporedno s drugim kupusnjačama, raštika je izrazito visoka biljka. Korijen joj je snažan i dubok a stabljika naraste i do 100 cm, a u prvoj godini vegetacije rastom je najveća te doseže i do 200 cm. Kao što je i vidljivo na Slici 3., listovi su spiralno raspoređeni a na vrhu stabljike formiraju rozetu. Dužina peteljke lista te sam oblik i veličina lista ovise na kojem dijelu stabljike se list nalazi. Donji listovi su na dužim peteljkama, okruglog su ili ovalnoj oblika, valovitog ili malo nazubljenog zuba, glatke ili malo valovite površine prekriveni voštanom prevlakom. (1) Listovi na srednjem dijelu stabljike spiralno obavijaju stabljiku u vršnom dijelu i čine rozetu. Listovi se sastoje od duge peteljke i zelene do sivo – zelene plojke. Plojka je naborana, posebice na rubovima listova i ima jako izražene žile kao što je vidljivo na Slici 4. (9)



Slika 4. Izgled lista raštike (11)

Već u drugoj godini vegetacije iz pazuha listova gornjeg dijela stabljike izbijaju cvjetne grane sa grozdastim cvatovima. Cvjetovi raštike su karakteristične građe za kupusnjače. Sastoje se od četiri eliptična lapa, četiri žute latice, 6 prašnika, te jedne dvogradne plodnice s više sjemenih zametaka. Plod je do 12 cm dugačka cilindrična komuška u kojoj se u dva reda nalazi poredano sjeme. Sjeme je jajasto-okruglastog oblika, crvenkasto smeđe boje, promjera do 3 mm. Sjemenke su male mase, a uz pravilno čuvanje sjeme može zadržati klijavost do 5 godina. (9)

1.2.2. Uzgoj raštike

Raštika je, po navodima uzgajivača, vrlo jednostavna biljka, vrlo skromnih zahtijeva. Jako dobro podnosi visoke temperature i sušu tijekom ljeta, a isto tako niske temperature i snijeg tijekom zime. Jedna je od rijetkih biljnih kultura koja odlično podnosi mraz, uzorci pokazuju i najbolja organoleptička svojstva nakon prvih zimskih mrazova jer se tada količina ukupnih šećera u biljci povećava gotovo dvostruko. Lako je prilagodljiva biljka, čemu pridonosi i voštana prevlaka na listovima a može se uzgajati na različitim vrstama tla i davati dobre prinose. Izrazito dobre prinose daje nakon gnojidbe, posebno stajskim gnojem. U plodoredu, kao prekulture raštici, veoma su dobre krumpir te mahunarke koje akumuliraju velike količine dušika u tlu. Raštika se najčešće uzgaja iz vlastite sjemenske produkcije i to iz presadnica koje se uzgajaju na otvorenom. U proljetnom roku sije se krajem veljače ili početkom ožujka a presađuje se u travnju. Drugi rok sjetve je tijekom srpnja iz kojeg se presađuje krajem kolovoza. U proizvodnji presadnica za uzgoj raštike te tijekom samog uzgoja u polju mogu se primijeniti isti tehnološki principi koji se primjenjuju u proizvodnji kupusa. (9)

1.2.3. Nutritivna vrijednost i kemijski sastav raštike

Zbog visokog udjela biološki aktivnih spojeva i njihovog pozitivnog djelovanja na organizam, raštika se smatra funkcionalnom hranom.(12) Njena nutritivna vrijednost i zdravstvene dobrobiti usporedivi su sa drugim dobro poznatim vrstama iz porodice kupusnjača (kelja pupčar, kupusa i kelj).(1)

Poznato je da su fitokemikalije zauzele sam vrh ljestvice primarnih istraživanja u polju prehrambene tehnologije i biotehnologije pa se tako poseban naglasak stavlja na istraživanja njihovog utjecaja na zdravlje čovjeka. Posebice je uočen pozitivan učinak glukozinolata i flavonoida kojima obiluje raštika. Smatra se da ovi spojevi imaju važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti kao što su bolesti kardiovaskularnog sustava, karcinom i bolesti vezane uz starenje. (12) Bogatstvo glukozinolata, flavonoida, vitamina i vlakana očituje se kroz antibakterijsko, antivirusno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje. (13)

Glukozinolati su složena skupina tioglukozidne strukture. Nalaze se u biljkama, sadrže sumpor i primarno su povezani sa zdravstvenim benefitima. Međutim, glukozinolati postaju aktivni tek kad se hidroliziraju endogenim biljnim enzimom, mirozinazom. Danas je poznato oko 200 različitih vrsta alifatskih, aromatskih i indolnih glukozinolata. Njihova podjela napravljena je prema strukturi aminokiseline glukozinolata: alifatski (nastali iz metionina, izoleucina, leucina

i valina), indolne (nastali iz triptofana) i aromatski (nastali iz fenilalanina i tirozina). (13) Unatoč sličnosti kemijskog profila, svaka vrsta iz porodice kupusnjača pokazuje drugačiji glukozinatni profil koji uključuje više od deset različitih glukozinolata ali najčešće dominiraju samo 3-4 vrste. Dominantnost alifatskih ugljikohidrata u raštici drže sinigrin, glucoiberin i glukorafanin. Sinigrin i produkt njegove hidrolize, alil izotiocijanat, povezani su sa terapijskim djelovanjem dok produkt hidrolize glukorafanina, sulforafan, ima utjecaj na smanjenje rizika od raznih vrsta raka, dijabetesa, ateroskleroze, bolesti dišnog sustava, neurodegenerativnih poremećaja, oftamoloških te kardiovaskularnih bolesti. (5)

Također, raštika obiluje vitaminom C te antioksidansima lutein i zeaksantin iz skupine polifenola. (14) U usporedbi s ostalim kupusnjačama (Tablica 4.) vidljivo je da raštika prednjači i u udjelima vitamina A te vitamina K.

Vitamin C ili askorbinska kiselina (AA) je vrlo važan hidrosolubilni vitamin. Djeluje kao potentan antioksidans u biološkim tekućinama, hvatajući fiziološki važne reaktivne spojeve, slobodne radikale (ROS i RNS). Hvatanjem slobodnih radikala AA sprječava oksidativnu štetu na značajnim biološkim makromolekulama, a to su DNA, lipidi i proteini. Esencijalna je za biosintezu kolagena, karnitina i neurotransmitera. AA iz hrane se lako apsorbira (80-90%) aktivnim transportom u crijevima. Međutim, vrlo je osjetljiva na zrak, svjetlost, toplinu i lako se uništava predugim skladištenjem i obradom hrane. Preporučena dnevna doza (RDA; *engl. Recommended Dietary Allowance*- količina nutrijenta koja se smatra nužnom za održavanje dobrog zdravlja) za AA iznosi 90 mg/d za muškarce i 75 mg/d za žene, s tim da je 100 mg/d dovoljno da zasiti tjelesne rezerve vitamina C u zdravih pojedinaca. Unos 100 mg/d je povezan sa smanjenim rizikom smrtnosti od srčanih oboljenja, moždanog udara i karcinoma a kao što vidimo iz Tablice 4., to je potpuno zadovoljeno konzumacijom jednog obroka raštike od 100g. (15) Osim što kao antioksidans sprječava oksidaciju drugih spojeva, vitamin C obnavlja tokoferoksilni radikal vitamina E te tako omogućava da vitamin E ponovno djeluje kao antioksidans. (16)

Minerali imaju bitnu ulogu u ljudskom organizmu i također doprinose dobrom zdravstvenom statusu. Povrće je bitan izvor minerala ali njihov utjecaj i iskoristivost u organizmu ovisi o nizu faktora kao što je način tehnološke obrade povrća, dnevni unos minerala, njihov kemijski oblik te prisutnost tvari koje ograničavaju ili povećavaju bioraspoloživost minerala kao i fiziološko stanje i sveukupno zdravlje potrošača. (17) Iz Tablice 3. vidimo kako raštika, usporedno s drugim navedenim kupusnjačama, prednjači u udjelu magnezija, kalija, fosfora ali ima i izrazito dobre udjele kalcija.

Obzirom na nutritivnu vrijednost i kemijski sastav raštika je bogata riznica organskih kiselina, lipida i minerala te slobodnih šećera. Uzimajući u obzir da raštika, kao i ostale kupusnjače, izvrsno podnosi zimu i niske temperature, zanimljivo je da se nakon perioda mraza udio ukupnih šećera poveća gotovo dvostruko. (17) Lipidi su djelomično odgovorni za fizikalna i kemijska svojstva hrane ali oni koji imaju glavni nutritivni značaj su zapravo esteri masnih kiselina. Međutim, uloga lipida u hrani je najčešće opisana kroz sastavni dio njihovih masnih kiselina. (17)

U Tablicama 2.-5. vidljive su usporedbe kemijsko-nutritivnog profila raštike sa ostalim vrstama iz porodice kupusnjača.

Tablica 2. Usporedba nutritivnih komponenti u nekoliko različitih vrsta kupusnjača (5)

	RAŠTIKA	KELJ	BROKULA	CVJETAČA	KUPUS	PROKULICA
VODA (g)	84,04	89,62	89,30	92,07	92,18	86,00
ENERGIJA (kcal)	49	32	34	25	25	43
PROTEINI (g)	4,28	3,02	2,82	1,92	1,28	3,38
LIPIDI (g)	0,93	0,61	0,37	0,28	0,10	0,30
UGLJIKOHIDRATI (g)	8,75	5,42	6,64	4,97	5,80	8,95
VLAKNA (g)	3,6	4,0	2,6	2,0	2,5	3,8
ŠEĆERI (g)	2,26	0,46	1,70	1,91	3,20	2,20

Tablica 3. Usporedba udjela minerala u nekoliko različitih kupusnjača (5)

MINERALI	RAŠTIKA	KELJ	BROKULA	CVJETAČA	KUPUS	PROKULICA
Ca (mg)	150	232	47	22	40	42
Fe (mg)	1,47	0,47	0,73	0,42	0,47	1,40
Mg (mg)	47	27	21	15	12	23
P (mg)	92	25	66	44	26	69
K (mg)	491	213	316	299	170	389
Na (mg)	38	17	33	30	18	25
Zn (mg)	0,56	0,21	0,41	0,27	0,18	0,42

Tablica 4. Usporedba udjela vitamina u nekoliko različitih kupusnjača (5)

VITAMINI	RAŠTIKA	KELJ	BROKULA	CVJETAČA	KUPUS	PROKULICA
Vitamin C (mg)	120	35,3	89,2	48,2	36,6	85
Tiamin (mg)	0,110	0,054	0,071	0,050	0,061	0,136
Riboflavin (mg)	0,130	0,130	0,117	0,060	0,040	0,090
Niacin (mg)	1,000	0,742	0,639	0,507	0,234	0,745
Vitamin B-6 (mg)	0,271	0,165	0,175	0,184	0,124	0,219
Folna kiselina (µg)	141	129	63	57	43	61
Vitamin A (µg)	500	251	31	0	5	38
Vitamin E (mg)	1,54	2,26	0,780	0,08	0,15	0,88
Vitamin K (µg)	704,8	437,1	101,6	15,5	76,0	177,0

Tablica 5. Usporedba udjela masnih kiselina među nekoliko različitih kupusnjača (5)

	RAŠTIKA	KELJ	BROKULA	CVJETAČA	KUPUS	PROKULICA
ZMK(g)	0,091	0,055	0,039	0,130	0,034	0,062
JNMK(mg)	0,052	0,030	0,011	0,034	0,017	0,023
VNMK(mg)	0,338	0,201	0,038	0,038	0,017	0,153

ZMK-zasićene kasne kiseline; JNMK- jednostruko nezasićene masne kiseline;
VNMK- višestruko nezasićene masne kiseline

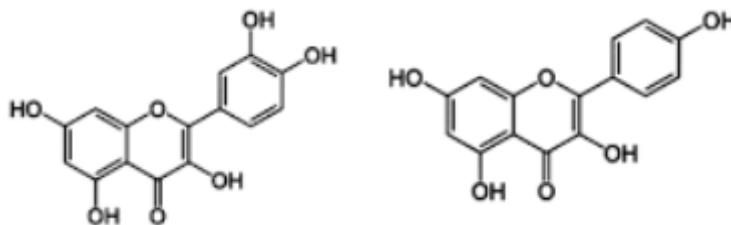
1.3. Fenolni sastav i antioksidacijska svojstva raštike

Fenolni spojevi su široka skupina biološki aktivnih spojeva, specijaliziranih biljnih metabolita, koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na flavonoide (flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine, izoflavone i flavane) i neflavonoide (fenolne kiseline, kumarini, tanini i stilbeni). (18) Znanstvena istraživanja pokazuju brojne dobrobiti njihovog djelovanja na veliki spektar bolesti od pretilosti, dijabetesa (tipa 2), metaboličkih sindroma pa sve do neurodegenerativnih bolesti, raka i brojnih dr. (5)

Promjenjivi sastav i udio bioaktivnih spojeva glavni su problem pri proizvodnji i predstavljanju određenih sorti povrća kao funkcionalne hrane jer potrošači očekuju ujednačenu razinu zdravstvene vrijednosti. Međutim, na udio i sastav bioaktivnih spojeva utječu brojni čimbenici kao što su: genotip biljke, utjecaj okoliša, kakvoća zemlje, zrelost u vrijeme branja biljke te

uvjeti skladištenja nakon branja. Fenolni spojevi, iako prisutni u svim biljnim tkivima, nisu ravnomjerno raspoređeni. Nisu isti udjeli fenolnih komponenti na razini stanice i na razini tkiva. Površinski slojevi biljaka bogatiji su fenolima nego unutarnji. Fenolni spojevi u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka. Također, u namirnicama pridonose ukupnom organoleptičkom profilu, sudjeluju u stvaranju okusa gorčine, oštine, mirisa i okusa te pridonose stvaranju boje i oksidativne stabilnosti. (13)

Znanstvenim istraživanjima vrsta iz roda *Brassica* dokazano je da fenolni spojevi, posebno u sinergiji s drugim spojevima, značajno doprinose biološkoj aktivnosti. Usporedba rezultata nekoliko već ranije naglasili da ovise o brojnim faktorima kao što su uvjeti uzgoja, sorta, stadij zrelosti, lokacija uzgoja i klimatski uvjeti. Međutim, postoji niz suvremenih, preciznih metoda (HPLC-MS, HPLC-DAD, GC-MS...) koje daju specifične i relevantne podatke o količini ukupnih fenola. Najbolje proučavana skupina fenolnih spojeva su flavonoidi. Literaturni dokazi znanstvenih istraživanja pokazuju kako su upravo kvercetin i kempferol (Slika 5.) najzastupljeniji flavonoidi u vrstama *Brassica oleracea* var. *acephala*, točnije njihovi mono- i tetra-glikozidi. (5)



Slika 5. Kemijska struktura kvercetina i kempferola (19)

Flavonoidi imaju antioksidativno djelovanje na više različitih načina a najznačajniji su kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala, prekidajući na taj način oksidativnu lančanu reakciju. Međutim, značajan je još jedan mogući način antioksidacijskog djelovanja flavonoida a to je njihova interakcija s drugim fiziološkim antioksidansima poput vitamina C te vitamina E. Sinergijski učinak djeluje mehanizmom zaštite fenolnih spojeva od oksidativne degeneracije. Međutim, unatoč brojnim istraživanjima mehanizam zaštitnog djelovanja fenolnih spojeva i dalje se smatra predmetom brojnih rasprava. (20)

Nadalje, fenolne kiseline također predstavljaju veliku i značajnu skupinu fenolnih spojeva rasprostranjenih u *Brassica* rodu. Predstavnici fenolnih kiselina, derivati benzojeve i cimetne

kiseline, osim što utječu na organoleptiku biljnih vrsta, pozitivno djeluju i na zdravlje kostiju. Dominantne fenolne kiseline u sortama vrste *Brassica oleracea var. acephala* su one iz hidroksimetne skupine (do 92,8% identificiranih fenolnih kiselina). Najveći udio u listovima raštike čine kava kiselina, ferulinska i sinapinska kiselina. (5)

1.3.1. Antioksidansi i mehanizmi djelovanja

Antioksidansi su tvari koje se nastoje oduprijeti oksidacijskom stresu na način da inhibiraju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula a to naposljetku dovodi do sprječavanja lančanih reakcija slobodnih radikala. (16) Najčešće slobodne radikale dijelimo na: dušikove (RNS, engl. *Reactive nitrogen species*-reaktivne dušikove vrste) i kisikove (ROS, engl. *Reactive oxygen species*-reaktivne kisikove vrste) reaktivne oblike. (16)

Ravnoteža ljudskog organizma poremećena je upravo onda kada se RNS i ROS, te ostali slobodni radikali nalaze na neprikladnim mjestima i kada su zastupljeni u velikoj količini. Kao posljedica toga nastaje stanje zvano oksidacijski stres. Takvo stanje u tijelu predstavlja neravnotežu između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti tijela da neutralizira njihove štetne učinke. (15) Da bi se uspostavila ravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala u tijelu, antioksidansi se moraju neprestano obnavljati jer oni u bilo kojem trenutku mogu reagirati sa slobodnim radikalima ponašajući se kao elektron donori. (16)

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti su brojne, ali obzirom na mehanizme djelovanja načešće ih dijelimo na metode koje se temelje na prijenosu vodika ili HAT (engl. *Hydrogen atom transfer*) i metode koje se temelje na prijenosu elektrona ili SET (engl. *Single electron transfer*) (Tablica 6.) (20) Bez obzira na mehanizam, krajnji rezultat je isti ali se razlikuju kinetika i potencijal sporednih reakcija. (20)

HAT metode mjere sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima donirajući im vodikov atom, *gaseći* na taj način njihovo štetno djelovanje. (20,21) Metode su brze i traju znatno kraće od SET metoda, a reakcije ne ovise o otapalu i pH vrijednosti sustava. (20,21)

Reakcije koje se temelje na SET mehanizmu mjere sposobnost potencijalnog antioksidansa da prenosi jedan elektron na nestabilnu molekulu, uključujući radikale, metale i karbonile. (22)

SET metode su obično spore i za razliku od HAT metoda zahtijevaju više vremena do dobivanja konačnih rezultata a tokom vremena dolazi do osjetnog pada kinetike i antioksidacijskog kapaciteta, tako da se izračunavanje kapaciteta antioksidansa temelji na postotnom smanjenju oksidacijske aktivnosti a ne na kinetici. (20,23)

Tablica 6. Antioksidacijske metode (20,21,22,23)

METODA	PUNI NAZIV METODE (engl.)	MEHANIZAM DJELOVANJA
ORAC	Oxygen radical absorbing capacity	HAT
TRAP	Total reactive antioxidant potential	HAT
TOSC	Total oxidant scavenging capacity	HAT
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity	SET
DPPH	2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay	SET
FCR	Folin-Ciocalteu reagens	SET
FRAP	Ferric-reducing antioxidant power	SET
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity	SET

1.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od metoda za pročišćavanje i za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Bez obzira radi li se o ekstrakciji iz tekuće (*ekstrakcija tekuće-tekuće*) ili iz čvrste faze (*ekstrakcija čvrsto-tekuće*), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu,
- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, otrovno i jeftino. (24)

Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljaka su voda, etanol, dietil-eter i druga organska otapala (kloroform, petroleter, diklormetan itd.).

Mehanizam provedbe ekstrakcije temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Pri tom dolazi do *razdjeljenja* (particije) tvari između dva otapala. Većinom su to voda (odnosno vodena otopina tvari) i neko organsko otapalo koje se ne miješa s vodom. (24)

Moderniji pristupi pripreme ekstrakata i izolacije željenih bioaktivnih komponenti uključuju: ultrazvučnu ekstrakciju (ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom), mikrovalnu ekstrakciju (ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima), mikrovalnu ekstrakciju bez otapala i ubranu ekstrakciju otapalom (ekstrakcija kod povišene temperature i tlaka) te ekstrakciju aromatičnog bilja sa subkritičnim i superkritičnim fluidima (primjer je ekstrakcija s CO₂). (24)

Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze izvodi se pri sobnoj temperaturi (maceriranje, perkoliranje) i pri povišenoj temperaturi. Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi može se izvesti zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom (refluksiranje), a zatim se još vruća otopina dekantira ili filtrira. (24)

Ekstrakcija tekuće-tekuće, koju nazivamo i izmućkavanje, izvodi se u lijevku za odjeljivanje. Izmućkavanjem otopine s nekim otapalom s kojim se ona ne miješa, stvara se velika dodirna površina između dvije tekuće faze i povećava uspješnost ekstrakcije. Učinak ekstrakcije je bolji ako se ona provodi više puta s manjom količinom otapala, nego jedanput upotrebom cijele količine otapala. (24)

Obzirom na specifičnost naše sirovine ne postoji mnogo znanstvenih istraživanja o njoj ali kao što je prethodno navedeno, postoje brojne metode za izolaciju bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Uzimajući sve činjenice u obzir provedene su ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji i mikrovalnom ekstraktoru kako bi odabrali optimalnu metodu kojom bi postigli najbolji učinak u izolaciji željenih komponenti. Nakon provedene ekstrakcije iz biljnog materijala, izvršena je filtracija a potom ekstrakcija tekuće-tekuće.

1.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UZV)

Ultrazvučna ekstrakcija se temelji na principu akustične kavitacije koja oštećuje stanične stijenke biljnog materijala čime pogoduje oslobađanju bioaktivnih komponenti u otapalo. Akustična kavitacija izaziva niz kompresija i razrjeđenja u molekulama otapala, uzrokujući stvaranje mjehurića kao rezultat promjena tlaka i temperature. Ova se tehnologija može primijeniti za izolaciju različitih fitokemikalija od koji se posebno ističu fenolni spojevi.

Ultrazvučna ekstrakcija je cijenjena i vrlo često upotrebljavana u raznim poljima industrije a posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj. (25)

Mehanizam rada ultrazvuka je takav da generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od oko 25 kHz (25000 ciklusa po sekundi) električne energije. Ta električna energija se dalje pomoću ultrazvučnih pretvarača pretvara u energiju zvuka. Uslijed djelovanja energije zvuka nastaju piezoelektrični kristali koji se šire i kontrahiraju u električnom polju. Zbog privlačenja polariziranih molekula pojavljuju se mehaničke vibracije koje se pojačalom pojačavaju, a ultrazvučni valovi se sandom emitiraju u medij. U mediju se potom formiraju milijuni mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a zatim naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. (26)

1.4.1.1. Utjecaj pojedinih parametara na UZV ekstrakciju

Bitnu ulogu kod provedbe UZV ekstrakcije imaju parametri provedbe o kojima ovisi učinkovitost ekstrakcije i prinosi a naposljetku i ishodišni rezultati. To je primarno način na koji je provedena UZV ekstrakcija (izravno ili neizravno) a zatim uvjeti ekstrakcije poput snage, frekvencije, vremena, temperature, vrste otapala i koncentracije. (25)

Jako bitu ulogu imaju *snaga i frekvencija*. Dulje izlaganje visokim frekvencijama (385-850 kHz) ili velikoj snazi (750 W) može prouzročiti razgradnju i/ili oksidaciju fenolnih spojeva pod utjecajem nastanka visoko reaktivnih hidroksilnih radikala. Iz tog se razloga u svim znanstvenim istraživanjima koja zahtijevaju precizne, sigurne i ponovljive rezultate koristi nisko frekventna oprema (20-60 kHz) jer takve frekvencije ne utječu na stabilnost bioaktivnih fenolnih komponenti. (25)

Priprema uzoraka za ekstrakciju, poput tehnike dehidracije ili načina smanjenja veličine čestica ima veliki učinak na prinos ekstrakcije fenolnih spojeva. Istraživanja su pokazala da je tako puno veći prinos ekstrakcije kod uzoraka koji su prethodno sušeni na zraku nego kod uzoraka koji su ubrzano sušeni pod utjecajem sunčeve topline. To se pripisuje stvaranju površinske opne na uzorcima sušenim ubrzanom postupkom što za posljedicu ima smanjenje koeficijenta prijenosa mase tijekom UZV ekstrakcije. Također, istraživanja su pokazala da je prinos puno bolji što su čestice uzorka manje jer je na taj način veća dodirna površina sirovine i otapala pa je i brzina prijenosa mase veća. (25)

Izbor otapala je bitna stavka prije provedbe ekstrakcije. Hidrofilne tvari se najčešće nalaze u biljnim vakuolama, dok se komponente poput lignina, flavonoida i u vodi netopivih polifenola talože u staničnoj stijenci pa se tako, ovisno o komponenti koju želimo izolirati, izabire otapalo

ali u konačnici bitno je da otapalo zadovolji sve stavke koje su prethodno navedene. Do sada provedena istraživanja i analize pokazuju da upotreba visoko čistih organskih otapala može dovesti do dehidracije i potpunog kolapsa biljne stanice kao i do denaturacije proteina stanične stijenke zbog čega je ekstrakcija fenolnih spojeva otežana. Zbog toga se hidro-alkoholne smjese različitih polariteta, poput onih s etanolom smatraju najprikladnijim za ekstrakciju fenolnih spojeva. Neki znanstvenici došli su do zaključka da je najbolji omjer 50%-50% smjese etanol-voda jer tako imaju najbolji sinergijski učinak budući da voda djeluje na bubrenje biljne stanice, povećavajući kontaktnu površinu, dok etanol inducira puknuće veze. (25)

Temperatura je jedan od glavnih čimbenika koji su uključeni u UZV ekstrakciju. Povećanjem temperature povećava se prinos ekstrakcije jer potiče brže puknuće veza, povećava topljivost spoja, veća je brzina difuzije otapala i prijenos mase a smanjuje se viskoznost i napetost otapala. Iako povećanje temperature ima mnoštvo pozitivnih značajki, ono također može potaknuti veću razgradnju i uništavanje spojeva koje zapravo želimo izolirati, to se posebno događa kada temperatura pređe iznad 75 °C. Još jedan negativan učinak previsokih temperatura je smanjenje konstante brzine ekstrakcije zbog smanjenja intenziteta kavitacije koji nastaje kao posljedica niže površinske napetosti i povišenog tlaka pare. (25)

Tijekom postupka UZV ekstrakcije biljni materijal je konstantno u kontaktu s otapalom pa na učinkovitost ekstrakcije veliki utjecaj ima upravo *vrijeme* interakcije između tih dviju faza. Neki znanstvenici su dokazali kako se koncentracija fenolnih spojeva ekstrahiranih ultrazvukom povećava s povećanjem vremena i taj period podijelili u 2 faze: prva faza je zapravo prvih 10 min ekstrakciju u kojima se odmah postiže otapanje i do 90% fenolnih komponenti, dok su drugu fazu okarakterizirali fazom polaganog ekstrahiranja u kojoj se prijenos mase otopljene tvari iz stanice u otapalo provodi difuzijom a vrijeme tog postupka može trajati 60-100 minuta. (25)

2.4.2. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija se smatra kao potencijalna alternativa tradicionalnoj kruto-tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju metabolita iz biljaka. U prednosti je pred konvencionalnim načinima ekstrakcije jer je smanjeno vrijeme ekstrakcije, smanjena je uporaba otapala i poboljšan je ekstrakcijski prinos. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje. (27)

Trenutno su razvijene dvije vrste komercijalno dostupnih sustava za ekstrakciju mikrovalovima: sustav zatvorenih posuda i sustav otvorenih posuda. Prvi se obično naziva ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice (engl. microwave-assisted extraction, MAE), pomoću koje se mogu ekstrahirati mnogi bioaktivni spojevi. Potonji se naziva fokusirana ekstrakcija Soxhletom ili ekstrakcija otapalom uz pomoć mikrovalne pećnice, u kojoj je uzorak uronjen u otapalo koje apsorbira mikrovalove u otvorenoj posudi ozračenoj fokusiranom mikrovalnom energijom do završetka ekstrakcije. (28)

Svaki mikrovalni sustav sastoji se obično od tri osnovna dijela: izvora mikrovalne pećnice, valovoda i aplikatora. Izvor mikrovalne pećnice je magnetron. Magnetron se sastoji od vakuumске cijevi sa središnjom katodom koja emitira elektrone vrlo negativnog potencijala, a okružena je strukturiranom anodom koja tvori šupljine, koje su spojene poljima i imaju predviđenu mikrovalnu rezonantnu frekvenciju. Izlaznom snagom magnetrona može se upravljati strujom cijevi ili jačinom magnetskog polja. Za vođenje elektromagnetskog vala mogu se koristiti dalekovodi i valovodi. (28)

1.4.2.1. Utjecaj pojedinih parametara na mikrovalnu ekstrakciju

U mikrovalnoj ekstrakciji najvažniji faktor je *izbor otapala*. Izbor otapala ovisi o topljivost željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i biljnog materijala te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom, da upijaju mikrovalove. Najvažnije je da izabrano otapalo ima visoku dielektričnu konstantu i da ima dobru mogućnost upijanja energije mikrovalova. Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom. (27) Za ekstrakciju termolabilnih spojeva može se upotrijebiti kombinacija otapala s relativno nižim dielektričnim svojstvima kako bi se osiguralo da temperatura otapala ostane niža za hlađenje otopljenih tvari nakon njihovog oslobađanja u otapalo. U ovom slučaju, mikrovalna energija ima prednost u interakciji s biljnim stanicama što dovodi do učinkovitog oslobađanja biljnih spojeva u hladnije otapalo. (28)

Što se tiče *vremena* zaključci su slični onim donesenima za UZV ekstrakciju. U mnogim provedenim istraživanjima i analizama ekstrakata dobivenih korištenjem mikrovalova primijećeno je da prinos ekstrakcije ima tendenciju povećanja s porastom vremena ekstrakcije, ali je porast prinosa bio vrlo mali s daljnjim povećanjem vremena, što možemo usporediti s pretpostavljene dvije faze u vremenu ekstrakcije koje su postavljene analizom UZV ekstrakcije. Kako je brzina zagrijavanja polarnih otapala poput etanola i metanola prilično visoka, zbog visokih dielektričnih svojstava, daljnje razrjeđivanje vodom povećava kapacitet

grijanja pa dulja primjena mikrovalova na uzorak u otapalu može dovesti do razgradnje ciljanih spojeva i do pregrijavanja cijelog sustava otopljene tvari/ otapala. (28)

Intenzitet mikrovalne snage kontrolira količinu energije koja se dovodi u uzorak koja se pretvara u toplinsku energiju u dielektričnom materijalu te dovodi do promjene njegove temperature. On utječe na interakcije i ravnotežnu brzinu te kontrolira raspodjelu analita između uzorka i otapala. Općenito je primijećeno da povećanjem snage mikrovalne pećnice dolazi do povećanja prinosa ekstrahiranog spoja, međutim prevelika mikrovalna snaga ipak može pretjerano povećati temperaturu sustava i smanjiti prinos ekstrakcije oštećenjem biljnog materijala ili potpunom razgradnjom spojeva. (28)

Ekstrakcija mikrovalovima na visokoj *temperaturi* može biti vrlo pogodna, kao i UZV ekstrakcija pri povećanim temperaturama. Razlog tomu je što temperatura uzrokuje povećanje međumolekularne interakcije unutar otapala, što dovodi do većeg molekularnog kretanja i na taj način povećava topljivost. Sve pozitivne činjenice povišenih temperatura koje su nabrojane u karakterizaciji parametara UZV ekstrakcije vrijede i ovdje. Međutim, u pojedinim je istraživanjima uočeno kako se učinkovitost ekstrakcije povećava s porastom temperature dok ne dođe do optimalne granice, nakon čega se počne smanjivati daljnjim porastom temperature. To opet sve varira o vrsti spojeva koji se žele ekstrahirati jer je temperatura razgradnje svakog spoja različita. (39) Postoji nekoliko znanstvenih istraživanja stabilnosti fenolnih komponenti provedbom mikrovalne ekstrakcije i utvrđena su poprilično slična zapažanja. U velikom istraživanju provedenom 2007. godine primijećeno je da su od 22 ispitivana fenolna spoja svi bili stabilni na temperaturama oko 100°C, dok je na 125°C došlo do značajne razgradnje i uništavanja određenih spojeva, posebno epikatehina, resveratrola i miricetina. (28) Drugi znanstveni tim ponovio je istraživanja godinu kasnije i došli su do sličnih zaključaka da se spojevi s većim brojem hidroksilnih skupina lakše razgrađuju na visokim temperaturama ekstrakcije, jer se u njihovom slučaju prinos flavonoida povećavao s porastom temperature od 90°C do 110°C, dok je već pri temperaturama višim od toga počela razgradnja nekih spojeva. (28)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu korišteni su svježi cijeli listovi raštike (list + peteljka) ubrani na području zapadne Hercegovine u razdoblju nakon zimskog mraza, sredinom veljače. Uzorkovanje je provedeno sa 12-15 različitih grmova raštike orijentiranih k sjevernom dijelu poljoprivredne površine različitih povrtnih kultura na tlu gnojnom prirodnim stajskim gnojem.

2.2. Uređaji

Od uređaja u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- Mikrovalni uređaj ETHOS-X, Milestone, Italija
- Ultrazvučna kupelj, Ultrasonic cleaner, Digital pro+, UK
- Tecan MicroPlates Reader, model SUNRISE, Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska
- Spektrofotometar LAMBDA EZ201 PERKIN ELMER, UK
- Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, UK
- Mikrotitarske pločice, nesterilne, Sarsted, Njemačka
- Sjeckalica

2.3. Kemikalije

Korišteni reagensi i otapala u radu su:

- Folin- Ciocalteu reagens
- Natrijev fosfat dihidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- Fluorescein, (*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany*)
- AAPH, 2,2-azobis (2- metilpropionamid)–dihidroklorid (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)

- Natrijev acetat, $\text{CH}_3\text{COONa}\times\text{H}_2\text{O}$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skoplje, Sjeverna Makedonija*);
- Glacijalna octena kiselina, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skoplje, Sjeverna Makedonija*);
- Klorovodična kiselina, 37% (*Pancreac, Barcelona, Španjolska*);
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$ (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*);
- Željezo (III) klorid, FeCl_3 (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*);
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, $M_r=250,29$ g/mol, 97% čistoće (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*);
- Etanol p.a. (*Alkaloid AD-Skopje, Skoplje, Sjeverna Makedonija*);
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, free radical), $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_6$ (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*);
- Diklormetan (CH_2Cl_2) stabiliziran s oko 0,002% 2-metilbut-2-enom, (*DBH PROLABO, UK*)

2.4. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je provedena uz pomoć mikrovalova i ultrazvuka (UZV) kako bi odabrali optimalnu metodu kojom bi postigli najbolji učinak u izolaciji željenih komponenti.

Za pripremu ekstrakata korišteni su svježi listovi raštike. Kao otapalo odbrani su voda i 50%-tna otopina etanola. Omjer biljnog materijala (rašlike) (g) i otapala (destilirana voda ili 50%-tna otopina etanola) (ml) bio je 1:5 kod svih metoda ekstrakcije.

Oznake pripremljenih uzoraka, kao i korišteno otapalo i metoda ekstrakcije prikazani su u Tablici 7:

Tablica 7. Prikaz oznaka za pripravljanje ekstrakte.

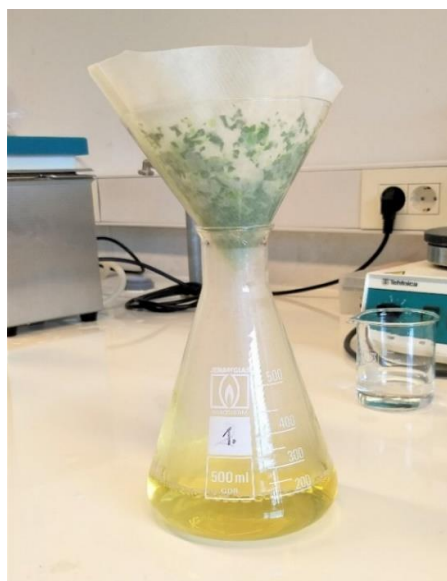
Oznaka	Otapalo	Metoda ekstrakcije
UZV H ₂ O	destilirana voda	UZV
UZV EtOH	50 %-tni etanol	UZV
MAE H ₂ O	destilirana voda	MAE
MAE EtOH	50 %-tni etanol	MAE

2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Za pripremu ekstrakata ultrazvukom odvagano je po 50 g listova raštike. Listovi su usitnjeni pomoću električne sjeckalice na vrlo male komadiće promjera nekoliko mm a potom je u svaku tikvicu dodano 250 ml otapala (u jednu tikvicu destilirana voda, u drugu otopina 50%-tnog etanola). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 2 sata pri temperaturi od od 60 °C na oba uzorka (Slika 6.). Nakon isteka predviđenog vremena i završetka ekstrakcije uzorci su filtrirani kroz naborani filter papir (Slika 7.) te prebačeni u Falcon epruvete.



Slika 6. Prikaz provedbe ekstrakcije u
UZV kupelji



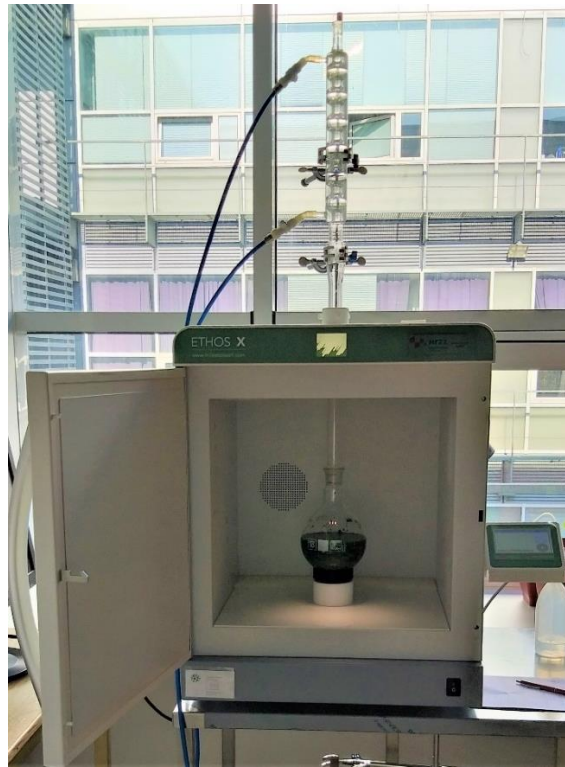
Slika 7. Filtracija kroz naborani
filter papir

2.4.2. Mikrovalna ekstrakcija

Za pripremu ekstrakata mikrovalovima odvagano je po 100 g listova raštike. Listovi su usitnjeni na isti način koji je opisan za UZV ekstrakciju, a potom su usitnjeni listovi prebačeni u tikvicu okruglog dna nakon čega je u svaku tikvicu dodano 500 ml otapala (u jednu tikvicu destilirana voda, u drugu otopina 50%-tnog etanola). Ekstrakcija je provedena u mikrovalnom ekstraktoru (Slika 8.) uz parametre prikazane u Tablici 8.

Tablica 8. Parametri mikrovalne ekstrakcije.

Oznaka uzorka	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
MAE H ₂ O	600	4	60
MAE EtOH	600	4	62



Slika 8. Prikaz provedbe ekstrakcije u mikrovalnom ekstraktoru



Slika 9. Prikaz uzorka u otopini 50%-tnog EtOH nakon mikrovalne ekstrakcije

Nakon provedene mikrovalne ekstrakcije i izolacije bioaktivnih komponenti i ovdje je provedena filtracija kroz naborani filter papir (Slika 7.)

2.5. Metoda određivanja ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima raštike provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (pod uvjetom da je pH otopine 10, što se postiže dodatkom Na_2CO_3) i nastajanju obojenog produkta. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se recuciraju i daju plavo obojenje.

Reagensi:

- *Folin-Coicalteu reagens*
- *20 %-tna otopina natrij karbonata (Na_2CO_3)*
- *Galna kiselina - matična otopina standarda (c=5 mg/mL)*

Postupak:

U kivete od 10 mm otpipetira se 25 μL uzorka, doda se 1,5 mL destilirane vode i 125 μL reagens Folin-Ciocalteu. Otopina se promiješa tipsom i nakon 1 minute doda se 375 μL 20%-tne otopine natrij karbonata Na_2CO_3 te još 475 μL destilirane vode. Ostavi se stajati na sobnoj temperaturi 2 sata u mraku, a nakon toga se očita apsorbancija na spektrofotometru na valnoj dužini od 765 nm. Dobiveni rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline u litri ekstrakta (mg GAE/L) pošto je standardizacija izvršena s galnom kiselinom. Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

2.7. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

2.7.1. FRAP metoda

FRAP (*ferric-reducing antioxidant power*) je jednostavna, brza, jeftina i robusna kolorimetrijska metoda koja je sveprisutna u znanstvenim i industrijskim ispitivanjima antioksidacijske aktivnosti. (29)

Mehanizam reakcije predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona (SET metoda), prilikom čega se mjeri redukcija feril-tripiridil-s-triazin kompleksa (Fe(III)–TPTZ). Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)–TPTZ u Fe(II) oblik, uslijed prisustva antioksidansa i pri niskom pH, dolazi do pojave plavog obojenja, maksimalne apsorpcije pri 595 nm. (20)

Reagensi:

- Acetatni pufer, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$, pH 3,6
- Otopina klorovodične kiseline (HCl), $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol/L}$
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl, $c(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6) = 10 \text{ mmol/L}$
- Otopina željezovog (III) klorida (FeCl_3), $c(\text{Fe}^{3+}) = 20 \text{ mmol/L}$
- FRAP reagens se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ i 2,5 mL otopine FeCl_3 .

Postupak:

U mikrotitarsku pločicu se otpipetira 300 μL svježe pripravljene otopine FRAPreagensa i očita mu se apsorbanca pri 595 nm. Potom se u reagens doda 10 μL uzorka i prati se promjena apsorbanca nakon 4 minute. Promjena apsorbanca, izračunava se kao razlika konačne vrijednosti apsorbanca reakcijske smjese nakon 4 minute i apsorbanca FRAP reagensa prije dodatka uzorka, te se uspoređuje s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda. Kao standard korišten je Trolox, a rezultati za FRAP otopina ekstrakata uspoređeni su s rezultatima za FRAP Troloxa i izraženi kao μM Trolox ekvivalenti (TE). Sva mjerenja izvršena su u 4 ponavljanja. Rezultati svih ispitivanja prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD.

2.7.2. ORAC metoda

ORAC (engl. *oxygen radical absorbance capacity* - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) metoda je znanstveno i industrijski popularan, standardizirani test kojim se reakcijskim mehanizmom prijenosa atoma vodika (HAT) mjeri stupanj inhibicije peroksil radikala ($ROO\cdot$). Izvor radikala je azo-spoj 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), koji se raspada na temperaturi od 37°C konstantnom brzinom te tako generira peroksil radikale. Fluorescentna proba u testu predstavlja staničnu molekulu koja je izložena oksidaciji od strane peroksidnog radikala, stimulirajući na taj način oksidativni stres. Dodani antioksidans iz uzorka se potom natječe s fluorescentnom probom (fluorescein) za radikale što u konačnici inhibira i usporava oksidaciju same probe. (30) ORAC je jedina metoda koja kombinira stupanj i trajanje inhibicije u jednu vrijednost, te daje informacije o zaštitnom učinku antioksidansa u dužem vremenskom periodu. (30). Kao standardna otopina u testu se koristi u vodi topivi analog vitamina E, odnosno sintetski antioksidans, pod nazivom Trolox, prikazan na Slici 6. ORAC vrijednosti obično se iskazuju kao ekvivalenti Troloxa. (20)

Reagensi:

- Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M
- Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M
- Fluorescein; Stock otopina (c=4,2 mM)
- Radna otopina fluoresceina (c=0,08 μ M)
- AAPH: 0,207 g AAPH otopi se u 5 mL 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h.
- Otopina standarda – Trolox: c= 5-50 μ M

Postupak:

U svaku rupicu mikrotitarske pločice doda se 150 μ L fluoresceina i 25 μ L uzorka prethodno razrijeđen 100 puta. Uzorak predstavljaju 0,075 M fosfatni pufer za slijepu probu (blank), otopina standarda Troloxa za izradu baždarne krivulje i uzorci ekstrakata raštike. Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C. Potom se dodaje 25 μ L AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri $\lambda_{eks} = 485$ nm i $\lambda_{em} = 520$ nm. Sva mjerenja su urađena u 3 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

2.7.3 DPPH metoda

DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrihidrazilom) je metoda *gašenja* slobodnih DPPH radikala (stabilni organski dušikov radikal) i jedna je od najpoznatijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti različitih ekstrakata i spojeva. (31) Ovom metodom dobivaju se informacije o reaktivnosti ispitivanog spoja sa stabilnim slobodnim radikalom. Zbog svog nesparenog elektrona, DPPH jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini 517 nm. (32) Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izračunava se preko postotka preostalog DPPH[•] koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. (20,33)

Reagensi:

- Otopina DPPH radikala, $c=0,04 \text{ mg/mL}$
- Radni DPPH pripravlja se razrjeđivanjem otopine DPPH radikala etanolom, sve dok se ne postigne apsorbancija otopine 1,2 ($\pm 0,002$) pri 492 nm i to neposredno prije mjerenja.

Postupak:

U mikrotitarske pločice otpipetira se volumen od 290 μL radne otopine DPPH radikala i očita se apsorbancija prije dodatka uzorka. Nakon toga, u otopinu DPPH radikala se doda 10 μL uzorka. Promjena apsorbancije pri 492 nm očita se nakon jednog sata. Sve analize, odnosno mjerenja izvršena su u 4 ponavljanja a rezultati iskazani kao srednja vrijednost \pm SD. Antioksidacijska aktivnost izražena je kao % inhibicije DPPH radikala izračunata prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH}^{\bullet} = [(A C(0) - A A(t)) / A C(0)] \times 100$$

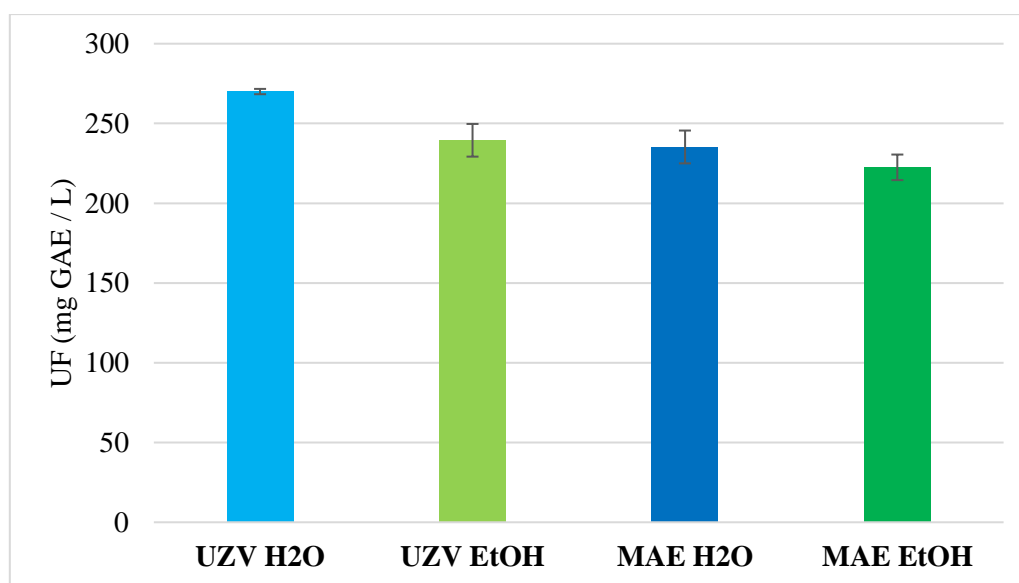
gdje je: $A C(0)$ – apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod $t = 0$ minuta;

$A A(t)$ – apsorbancija reakcijske smjese nakon 1 h.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

U općem dijelu ovog rada naglasili smo da je broj znanstvenih istraživanja raštike jako mali i da je svakim danom interes istraživača za ovom biljkom sve veći. Međutim, primjena različitih metoda ekstrakcije i korištenih otapala, daje velike razlike u fenolnom sastavu pripremljenih ekstrakata što otežava njihovu usporedbu. Nedovoljno podataka o najpovoljnijim metodama pripreme ekstrakata bili su prvi parametri na koje se fokusiralo u pripravi ekstrakata raštike korištenih u ovom radu. Primjenom UZV i MAE ekstrakcije, te korištenjem dva otapala na osnovu različite polarnosti (voda i 50%-tni etanol), pripravljena su četiri različita ekstrakta. Određivanje ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijskom metodom, a dobiveni rezultati su prikazani na Slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola ekstrakata raštike

Iz grafičkog prikaza vidljiv je najveći udio fenola u vodenom ekstraktima raštike pripremljenim djelovanjem ultrazvuka ($270,0 \pm 1,67$ mg GAE/L) i mikrovalova ($251,4 \pm 10,29$). Obzirom na činjenicu da su fenolni spojevi polarne molekule možemo uočiti je da u ovom slučaju voda, s većom polarnosti u odnosu na 50%-tnu otopinu etanola, utjecala na bolji prinos fenolnih komponenti u ispitivanim uzorcima. Ako uspoređujemo metode primijenjene ekstrakcije, bez obzira na veći fenolni prinos u ekstraktima pripremljenijim UZV, moramo istaknuti da je MAE ipak bolji izbor obzirom na kraće vrijeme provedbe ekstrakcije. Dakle, MAE ekstrakcijom u

trajanju od 4 min postigli smo gotovo slični udio fenolnih komponenti (227-251 mg GAE/L) u testiranim ekstraktima kao i kod onih koji su pripremljeni UZV u trajanju od 2 h (246-270 mg GAE/L). Parametar temperature je u svim vrstama ekstrakcije bio isti i nema utjecaja na prinos fenola. Što se tiče jačine mikrovalova i ultrazvuka, u oba slučaja je primijenjena niža vrijednost, odnosno niska frekvencija (40 kHz) i intenzitet mikrovalova od 600 W.

Pregledom dostupne literature mogu se uočiti razlike u sadržaju ukupnih fenola u ekstraktima raštike zbog korištenih različitih otapala i metoda ekstrakcije, ali isto tako i modifikacija metode kojem su isti određeni.

Kural i sur. (2011) su u svom radu uspoređivali vodeni i metanolni ekstrakt suhog lišća raštike pripremljenog po Soxhletu u trajanju od 24 h i dobili su veći udio ukupnih fenola (55,2 mg GAE/g suhog lišća) u metanolnom ekstraktu u odnosu na vodeni ekstrakt (34,3 mg GAE/g suhog lišća). (34)

Ayaz F. i sur. (2008) su također pripremali ekstrakte lišća raštike metodom po Soxhletu s n-heksanom i naftnim eterom. Identificirano je i HPLC-MS analizom kvantificirano 9 fenolnih kiselina. Najzastupljenije kiseline bile su ferulinska (169 ng/g svježeg lista raštike u slobodnom i 170 ng/g svježeg lista raštike u esterskom obliku) i kava kiselina (2040 ng/g svježeg lista raštike u glikozidu i 2640 ng/g svježeg lista raštike u esterskim oblicima). Utvrđeno je i da sadržaj ukupnih fenola u analiziranim svježim listovima raštike iznosi 1366 ng/g. (35)

Michalak i sur. (2020.) su pažljivom kvalitativnom analizom fenolnog profila ekstrakata raštike identificirali nekoliko spojeva. Otkriveno je da su ekstrakti metanola bogati izvori jednostavnih fenolnih kiselina i flavonoida. Među prvima su s velikom preciznošću mase identificirane ferulinska kiselina, kava kiselina, protokatehinska, klorogenska, vanilinska, *p*-kumarinske, cimetna i sinapinska. Ekstrakcija je provedena u čvrstoj fazi (SPE) prema postupku koji je predložio proizvođač (Strata-X 33 um polimerna reverzna faza SPE kolona, Phenomenex 8B-S100-FBJ). (36)

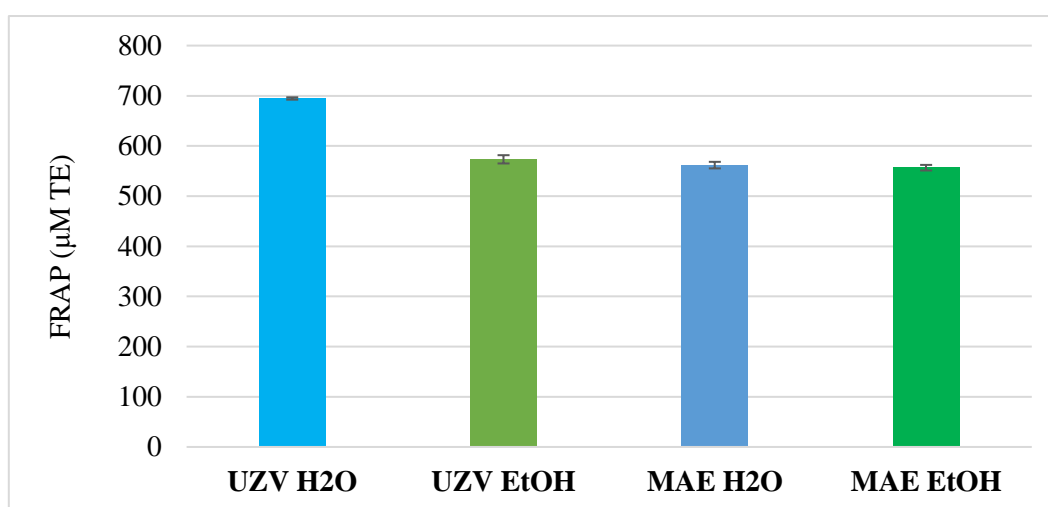
Zohu i Yu (2006.) proveli su analize na uzorcima raštike u 50%-tnoj otopini etanola koji su ekstrahirani pod dušikom na sobnoj temperaturi. Uspoređujući raštiku, špinat i rabarbaru, raštika je pokazala najveći udio ukupnih fenola a vrijednost se kretala 16,3–18,8 mg GAE/g. (37)

S druge pak strane, Korus i Lisiewska (2011.) u svom istraživanju pokazuju da je udio ukupnih fenola u svježim listovima raštike 384,9 mg GAE/100g. Od identificiranih fenolnih spojeva, u najvećoj je količini bila ferulinska kiselina (240,44 mg/100 g, što čini 62% ukupnih polifenola). Sadržaj kaempferola (59,64 mg/100 g) i kava kiseline (41,54 mg/100 g) bio je znatno niži,

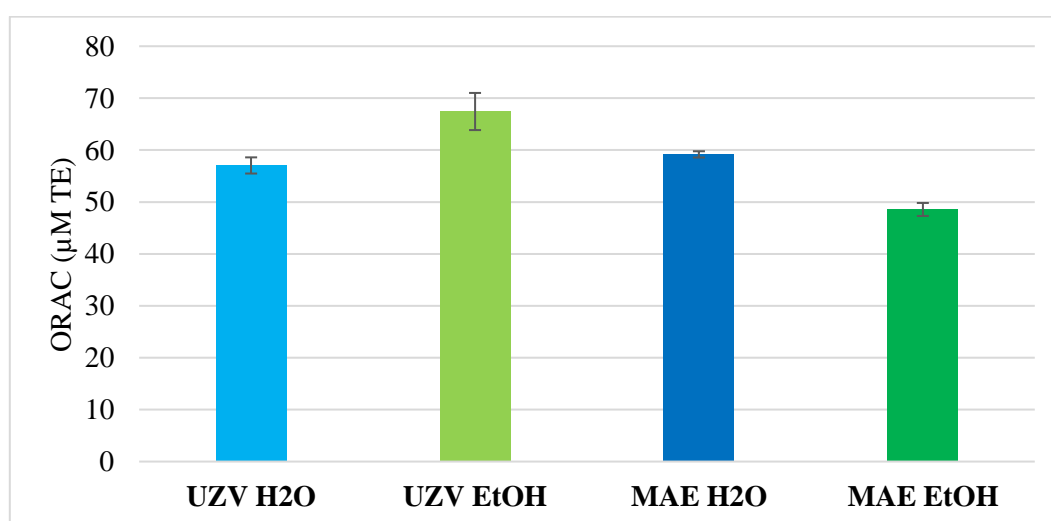
čineći 15%, odnosno 11% polifenola. Sadržaj kvercetina, *p*-kumarinske kiseline i sinapinske kiseline činio je manje od 5% ukupnih polifenola. (38)

Kako istraživanja pokazuju, dominantne fenolne kiseline su one iz podgrupe hidroksicimetnih kiselina (do 92,8% identificiranih fenolnih kiselina) (Ayaz i sur., 2008.; Lin i sur., 2009.; Olsen, Aaby i Borge 2009.;Olsen, Aaby i Borge 2010). U listovima raštike najčešće identificirane fenolne kiseline su ferulinska, sinapinska, kava kiselina i njihovi derivati. (5)

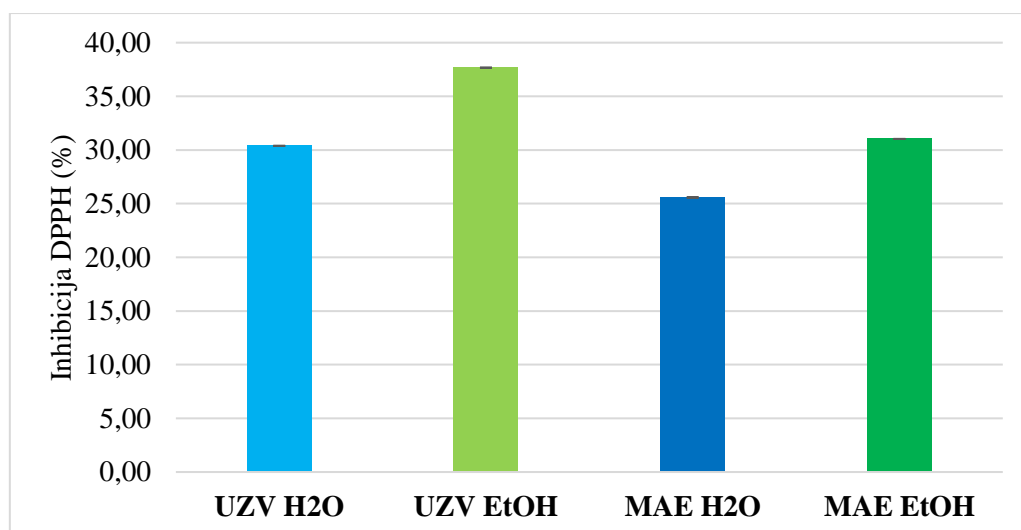
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti



Slika 11. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata raštike FRAP metodom



Slika 12. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata raštike ORAC metodom



Slika 13. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata raštike DPPH metodom

Rezultati ispitivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata raštike prikazani su na Slikama 11-13. Antioksidacijska aktivnost određena metodom FRAP (Slika 11.) bila je najbolja u ekstraktu raštike UZV H₂O s vrijednosti 695 μ M TE, dok je najslabiju aktivnost pokazao ekstrakt MAE EtOH s FRAP vrijednosti od 557 μ M TE, što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola. Iako smo u općem dijelu naveli da metode DPPH i FRAP imaju isti mehanizme djelovanja (SET metode) u ovom radu nisu dali slične rezultate. Korištenjem metode DPPH dobiven je nešto drugačiji odnos aktivnosti. U ovoj metodi (Slika 13.) najveći % inhibicije DPPH radikala pokazali su ekstrakti raštike pripremljeni u 50%-tnoj otopini etanola (UZV EtOH = 37,61% i MAE EtOH = 31,01%), dok vodeni ekstrakti pokazuju nešto slabiju aktivnost. Obzirom da se sam slobodni DPPH radikal otapa u etanolu, možemo pretpostaviti da je to jedan od razloga za razlike u aktivnosti. Isto tako pregledom brojnih istraživanja i znanstvenih radova, pojedini autori DPPH metodu ne svrstavaju u SET metodu već u HAT. (35)

Navedena odstupanja u djelovanju ekstrakta u usporedbi s sadržajem ukupnih fenola se javljaju i kod ORAC metode. ORAC metoda je metoda koja je 100%-tno temeljena na HAT mehanizmu i kao što je vidljivo na Slici 12., najbolju aktivnost pokazuje ekstrakt raštike UZV EtOH ($67,43 \pm 3,58$ μ M TE), dok je u ovom slučaju najslabiju aktivnost imao ekstrakt MAE EtOH ($48,56 \pm 1,26$ μ M TE). Vodeni ekstrakti raštike su ORAC metodom pokazali slično djelovanje i njihove ORAC vrijednosti su se kretale oko 57,04-59,17 μ M TE. Zanimljivo je kako uzorci ekstrahirani u destiliranoj vodi u ORAC metodi daju rezultate s vrlo malim razlikama pa je vrlo teško odrediti koja metoda ekstrakcije je učinkovitija za uzorke otopljene u destiliranoj vodi gledajući antioksidacijsku aktivnost. S druge pak strane, za uzorke otopljene

u etanolu vidimo veliku razliku antioksidacijske aktivnosti za uzorke ekstrahirane ultrazvukom i mikrovalovima kod ORAC metode ali i kod DPPH metode.

Na antioksidacijski potencijal raštike ukazuju i nekoliko istraživanja (Zhou i Yu 2006; Ayes i sur. 2008; Hagen, Borges, Solvang i Bentsen 2009; Korus i Lisiewska 2011; Korus 2011; Becerra-Moreno i dr. 2013). Bez obzira na odstupanja u rezultatima, koja se pripisuju različitom fenotipu, načinu uzgoja i dijelovima godine kada su uzorci prikupljeni, metodama ekstrakcije, korištenim otapalima i sl., nedvojbeno je da su svi analizirani uzorci raštike pokazali dobro antioksidacijsko djelovanje. (5)

Sikora i sur. (2008) mjerili su antioksidacijsku aktivnost u raštici, brokuli, prokulici i zelenoj i bijeloj cvjetači te otkrili da je raštika imala znatno veću aktivnost u usporedbi s drugim analiziranim povrćem. (39)

Znanstvena studija Zhou i Yu (2006.) u kojoj je određen antioksidacijski potencijal 38 najčešće konzumiranih povrtnih kultura primjenom nekoliko metoda izdvaja raštiku, zajedno sa špinatom, brokulom i rabarbarom, kao povrće s najvišim antioksidacijskim djelovanjem. Analiza je provedena na osušenim uzorcima u 50%-tnoj otopini acetona, ekstrakcija je provedena pod dušikom na sobnoj temperaturi. Ovaj podatak još jednom ukazuje na neupitno dobar antioksidacijski potencijal ekstrakta raštike bez obzira na metodu ekstrakcije. (37)

Tako npr. Ayaz i sur. (2008.) zaključuju da je sveukupna aktivnost njihovih uzoraka ekstrahiranih metodom po Soxhletu s n-heksanom i naftnim eterom bila u visokoj korelaciji s njihovim ukupnim sadržajem fenola ($r = 0,969$), a naveli su da su rezultati također u skladu s prethodno provedenim istraživanjima drugih znanstvenika (Beta i sur., 2005; Bouaziz i sur., 2004; Kuti & Konuru, 2004; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006). (35)

Također, Korus (2011) u svojim samostalnim istraživanjima navodi da je FRAP vrijednost ekstrakta raštike iznosila 71 mM Trolox/1 g suhe tvari. (40)

Iako su u svom radu Kural i sur (2011.) naveli da metanolni ekstrakti raštike imaju bolji udio fenola, vodeni ekstrakti su u ovom radu pokazali jači antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom, što je u ovom diplomskom radu bio slučaj samo kod vodenog ekstrakta pripremljenog ultrazvukom i to kod FRAP i DPPH metode. Vodeni ekstrakti pripremljeni mikrovalnom ekstrakcijom pokazali su bolji antioksidacijski učinak samo ORAC metodom. (34)

4. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Dobiveni rezultati se nedvojbeno razlikuju, no svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobru antioksidacijsku aktivnost i sličan udio ukupnih fenola.
- Najbolje ekstrakcijsko otapalo se pokazala voda jer su ekstrakti pripremljeni u vodi prosječno davali veći udio ukupnih fenola.
- Uspoređujući metode ekstrakcije, bez obzira na nešto veći fenolni prinos u ekstraktima pripremljenijim UZV, kao bolji izbor se ipak čini MAE obzirom na znatno kraće vrijeme provedbe ekstrakcije.
- Antioksidacijska aktivnost provedena FRAP metodom dala je najbolje rezultate i u potpunoj je korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola dok su ORAC i DPPH metode pokazuju nešto drugačije rezultate, no ukupno gledano, svi ispitivani uzorci su bez sumnje pokazali dobar antioksidacijski potencijal.

5. LITERATURA

- (1) Anonymus, Krstašice - kupusnjače (*Brassicaceae*), pristup na URL: https://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_4/PDF/Kupusnja%20c4%208de.pdf (pristupljeno: 29.6.2020.)
- (2) Matotan Z., Očuvanje i zaštita starih domaćih sorti povrća, Sjemenarstvo 24; 35-40, 2007.
- (3) Qin F., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance, *Plant Cell Physiol* 52;1569–1582 .
- (4) Pavlović I., Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (*Brassicaceae*) na povišeni salinitet, Doktorski rad, Osijek, 2017.
- (5) Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi B., Kale (*Brassica oleracea var. acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, 2008.
- (6) Batelja K., Goreta Ban S., Žanić K., Miloš B., Dumičić G., Matotan Z., Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleracea L.var.acephala*) hrvatskog priobalja, 2009.
- (7) Cartea M.E., Picoaga A., Soengas P., Ordas A., Morphological characterisation of kale populations from northwestern Spain, *Euphytica* 129;25 -32., 2002.
- (8) fotografija dostupna na URL: <http://klajo-blog.com/rastika-2/> (pristupljeno: 7.7.2020.)
- (9) Matotan Z., stručni članak dostupan na URL: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ra%C5%A1tika>
- (10) fotografija dostupna na URL: <https://visiani.botanic.hr/fcd-gallery/Photo/Show/34015> (pristupljeno: 12.9.2020.)
- (11) fotografija dostupna na URL: <https://www.agromedia.rs/agro-teme/povrtarstvo/rastan-zimsko-povrce> (pristupljeno: 15.7.2020.)
- (12) Kopjar M., Šubarić D., Piližota V., Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi, znanstveno- stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku: Hrana u zdravlju i bolesti, 2012.
- (13) Radojčić-Redovniković I., Cvjetko-Bubalo M., Panić M., Radošević K., Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule, Stručni rad, Glasnik zaštite bilja, vol.39:5., studeni 2016.
- (14) G. Mateljan, Najzdravije namirnice svijeta, PROFIL, 2008.
- (15) Vehtersbah-Stojan P., Antioksidansi u aterosklerozi, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
- (16) Knez M., Antioksidansi, Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2014.

- (17) Ayaz F.A., Glew R.H., Millson M., Huang H.S., Chuang L.T., Sanz C., Nutrient contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.), Food Chemistry 96; 572-579, 2006.
- (18) Lisica P., Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zgreb, 2016.
- (19) fotografija dostupna na URL: https://www.researchgate.net/figure/Fig-2-Structure-of-quercetin-kaempferol-and-myricetin_fig1_325606565 (pristupljeno: 20,7,2020.)
- (20) Prior R., Xianli W., Schaich K., Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. J. Agric. Food Chem., 2005;53(1):4290-4302.
- (21) Buljeta I., Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (*Satureja montana* L.), Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2005.
- (22) Jakelić M. Jednostavni i parcijalno-linearni regresijski modeli primijenjeni na različitim svojstvima vodenih biljnih ekstrakata, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016
- (23) Karadag A., Ozcelik B., Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. Food Anal Methods, 2009;2:41-60.
- Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A., Free radicals and brain aging. Clin Geriatr Med. 2004;329–359.
- (24) Jerković I., Radonić A., Praktikum iz organske kemije, Kemijsko – tehnološki fakultet, Split, 2009.
- (25) Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N., Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources, Agronomy, MDPI, 2017., vol. 7 (47)
- (26) Drmić H., Režek Jambrak A., Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croat. J. Food Sci. Technol., 2010., vol.2 (2):22-33
- (27) Blekić M., Režek Jambrak A., Chemak F., Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croat. J. Food Sci. Technol. 2011., vol. 3(1):32-47
- (28) Routray W., Orsat V., Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review, Food Bioprocess Technol., 2012., vol. 5:409–424
- (29) Štolar I., Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.

- (30) Roje B., Usporedba fluorescentnih probi u ORAC metodi, Prirodoslovno-matematički fakultet, Odjel za kemiju, Split, 2015.
- (31) Sagar B., Singh R., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, J Food Sci Technol, AFSTI; srpanj- kolovoz 2011., vol. 48(4):412–422
- (32) Kazazić S.P., Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavanoida, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2004, vol. 55:279-290
- (33) Akar Z., Kuc M., Dogan H., A new colorimetric DPPH scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2017, vol. 32, no. 1: 640–647
- (34) Kural B. V., Küçük N., Yücesan Balaban F., Öreml A., Effects of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) leaves extracts on the susceptibility of very low and low density lipoproteins to oxidation, Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2011., vol. 48, 361-364
- (35) Ayaz F. A., Hayırlıoğlu-Ayaz S., Alpay-Karaoğlu S., Gruz c J. , Valentova K. , Ulrichova J. , Strnad M., Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities, Food chemistry, 2008., vol. 107,19–25
- (36) Michalak M., Sz wajger D., Paduch R., Kukola-Koch W., Wasko A., Fermented curly kale as a new source of gentisic and salicylic acids with antitumor potential, Journal of Functional Foods, 2020., vol. 67,103866
- (37) Zhou K., Yu L., Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado, LWT, 2006., vol. 39, 1155–1162
- (38) Korus A., Lisiewska Z., Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. Food Chemistry, 2011., vol.129, 149-154
- (39) Sikora E., Cieslik E., Leszczyńska T., Filipak A., Pisuliewski P. M., The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing, Food Chemistry, 2008., vol. 107 (1), 55-59
- (40) Korus A., Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves, LWT - Food Science and Technology, 2011., vol.44 (8), 1711-1716.