Utjecaj različitih metoda i parametara ekstrakcije na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost borovice (Juniperus communic L.)

Botić, Viktorija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:458057

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ RAZLIČITIH METODA I PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA FENOLNI PROFIL I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST BOROVICE (*Juniperus communis* L.)

DIPLOMSKI RAD

VIKTORIJA BOTIĆ

Matični broj: 6

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

UTJECAJ RAZLIČITIH METODA I PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA FENOLNI PROFIL I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST BOROVICE (*Juniperus communis* L.)

DIPLOMSKI RAD

VIKTORIJA BOTIĆ
Matični broj: 6

Split, listopad 2020.

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

THE EFFECT OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND PARAMETERS ON THE PHENOLIC PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON JUNIPER (*Juniperus communis* L.)

DIPLOMA THESIS

VIKTORIJA BOTIĆ
Parent number: 6

Split, October 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-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 Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc.Vida Šimat

UTJECAJ RAZLIČITIH METODA I PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA FENOLNI PROFIL I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST BOROVICE(*Juniperus communis* L.)

Viktorija Botić, 6

Sažetak:
Borovica (*Juniperus communis* L.) je zimzeleni, bodljikavi grm iz porodice čempresovki (*Cupressaceae*) koja raste na području Europe, Azije, Sjeverne Afrike i Sjeverne Amerike. Od davnina se koristi u tradicionalnoj medicini, a u zadnje vrijeme je sve češće predmet brojnih istraživanja zbog dobrog kemijskog sastava i biološke aktivnosti. U ovom radu ispitana je primjena različitih metoda ekstrakcije (ultrazvučna-UZV i mikrovalna-MAE), kao i otapala (voda i 50%-tni etanol), na prinos ukupnih fenola u ekstraktima crvenih i zelenih plodova borovice te iglica borovice. Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. U cilju ispitivanja antioksidacijske aktivnosti korištene su tri metode: FRAP (engl.*Ferric-reducing antioxidant power*), ORAC (engl.*Oxygen radical absorbing capacity*) i DPPH (engl.*2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*). Svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobru antioksidacijsku aktivnost i bogat udio ukupnih fenola. Kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se etanol jer su etanolni ekstrakti davali veći udio fenola i bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vodu. Uspoređujući UZV i MAE ekstrakciju može se zaključiti da je MAE bolji izbor jer većinom daje bolje rezultate za kraće vrijeme provedbe ekstrakcije. Rezultati dobiveni FRAP, ORAC i DPPH metodama ukazuju da MAE etanolni ekstrakt iglice borovice pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola,slijede ekstrakti zelene borovice i na kraju kao ekstrakti s najslabijom antioksidacijskom aktivnošću i najmanjom količinom fenola pokazali su se ekstrakti crvene borovice.

Ključne riječi:borovica, fenolni profil, antioksidacijska aktivnost, FRAP, ORAC DPPH

Rad sadrži: 46stranica, 26 slika, 2 tablice, 61 literaturna referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek, član-predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc.Vida Šimat, član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza, mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-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: Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.
Technical assistance: Associate Professor Vida Šimat,Ph. D.

THE EFFECT OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND PARAMETERS ON THE PHENOL PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON JUNIPER (*Juniperus communis* L.)

Viktorija Botić, 6

Abstract:
Juniperus communis is an evergreen, prickly bush from the cypress family (*Cupressaceae*) that grows in Europe, Asia, North Africa and North America. It has been used in traditional medicine since ancient times, and recently it has been the subject of numerous researches due to its good chemical composition and biological activity. In this paper, the application ultrasound (UZV) and microwave (MAE) assisted extraction, as well as two solvents (water and 50% ethanol), on the yield of total phenols in extracts of red and green common juniper fruits and leafs was investigated. The proportion of total phenols was determined by the Folin-Ciocalte spectrophotometric method. In order to test antioxidant activity, three methods were used: FRAP (Ferric-reducing antioxidant power), ORAC (Oxygen radical absorbing capacity) and DPPH (2,2, -Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay). All tested samples show extremely good antioxidant activity and a rich content of total phenols. Ethanol proved to be the best extraction solvent because ethanol extracts gave a higher phenol content and better antioxidant activity compared to water. Comparing UZV and MAE extraction, MAE has shown to be a better choice as it gives better results for a shorter extraction time. The results obtained by FRAP, ORAC and DPPH methods indicated that MAE ethanolic extract of common juniper leafs shows the strongest antioxidant activity, which correlates with the content of total phenols, followed by extracts of green berries and finally red berries as extracts with the weakest antioxidant activity and the least amount of total phenols.

Key words: *Juniperus communis* L.,phenolic profile, antioxidant activity, FRAP, ORAC, DPPH

Thesis contains: 46pages, 26 figures, 2 tables, 61 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant Professor Mario Nikola Mužek,Ph. D.
2. Associate Professor Vida Šimat,Ph. D.
3. Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed 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 je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood(Reference Number: 2019-SECTION2-4).

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na ukazanom povjerenju, uloženom vremenu, trudu i pomoći tijekom izrade ovog rada, ali i za svu potporu tijekom studija. Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Vidi Šimat na pomoći pri izradi diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svojim prijateljima, koji su bili oslonac i studentske dane ispunili srećom.

Za kraj, najveće hvala mojim roditeljima na povjerenju, razumijevanju i bezuvjetnoj podršci tijekom studija.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

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

SAŽETAK

Borovica (*Juniperus communis* L.) je zimzeleni, bodljikavi grm iz porodice čempresovki (*Cupressaceae*) koja raste na području Europe, Azije, Sjeverne Afrike i Sjeverne Amerike. Od davnina se koristi u tradicionalnoj medicini, a u zadnje vrijeme je sve češće predmet brojnih istraživanja zbog dobrog kemijskog sastava i biološke aktivnosti. U ovom radu ispitana je primjena različitih metoda ekstrakcije (ultrazvučna-UZV i mikrovalna-MAE), kao i otapala (voda i 50%-tni etanol), na prinos ukupnih fenola u ekstraktima crvenih i zelenih plodova borovice te iglica borovice. Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. U cilju ispitivanja antioksidacijske aktivnosti korištene su tri metode: FRAP (engl.*Ferric-reducing antioxidant power*), ORAC (engl.*Oxygen radical absorbing capacity*) i DPPH (engl.*2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*). Svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobru antioksidacijsku aktivnost i bogat udio ukupnih fenola. Kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se etanol jer su etanolni ekstrakti davali veći udio fenola i bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vodu. Uspoređujući UZV i MAE ekstrakciju može se zaključiti da je MAE bolji izbor jer većinom daje bolje rezultate za kraće vrijeme provedbe ekstrakcije. Rezultati dobiveni FRAP, ORAC i DPPH metodama ukazuju da MAE etanolni ekstrakt iglice borovice pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola, slijede ekstrakti zelene borovice i na kraju kao ekstrakti s najslabijom antioksidacijskom aktivnošću i najmanjom količinom fenola pokazali su se ekstrakti crvene borovice.

Ključne riječi:borovica, fenolni profil, antioksidacijska aktivnost, FRAP,ORAC DPPH

SUMMARY

Juniperus communis is an evergreen, prickly bush from the cypress family (*Cupressaceae*) that grows in Europe, Asia, North Africa and North America. It has been used in traditional medicine since ancient times, and recently it has been the subject of numerous researches due to its good chemical composition and biological activity. In this paper, the application ultrasound (UZV) and microwave (MAE) assisted extraction, as well as two solvents (water and 50% ethanol), on the yield of total phenols in extracts of red and green common juniper fruits and leafs was investigated. The proportion of total phenols was determined by the Folin-Ciocalte spectrophotometric method. In order to test antioxidant activity, three methods were used: FRAP (Ferric-reducing antioxidant power), ORAC (Oxygen radical absorbing capacity) and DPPH (2,2, -Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay). All tested samples show extremely good antioxidant activity and a rich content of total phenols. Ethanol proved to be the best extraction solvent because ethanol extracts gave a higher phenol content and better antioxidant activity compared to water. Comparing UZV and MAE extraction, MAE has shown to be a better choice as it gives better results for a shorter extraction time. The results obtained by FRAP, ORAC and DPPH methods indicated that MAE ethanolic extract of common juniper leafs shows the strongest antioxidant activity, which correlates with the content of total phenols, followed by extracts of green berries and finally red berries as extracts with the weakest antioxidant activity and the least amount of total phenols.

Key words:*Juniperus communis* L.,phenolicprofile, antioxidant activity, FRAP, ORAC, DPPH

SADRŽAJ

UVOD **1**
1. OPĆI DIO **2**
1.1. Borovica 2
1.2. Kemijski sastav 3
1.3. Upotreba borovice 9
1.4. Biološki učinci borovice 11
1.4.1. Antimikrobni učinak borovice 11
1.4.2. Antioksidacijski učinak borovice 12
1.4.3. Ostale aktivnosti 14
1.5. Ekstrakcija 15
1.5.1. Mikrovalna ekstrakcija 17
1.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija 20
2. **EKSPERIMENTALNI DIO** 25
2.1. BILJNI MATERIJAL 25
2.2. UREĐAJI I KEMIKALIJE 25
2.3. POSTUPAK EKSTRAKCIJE 26
2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UZV) 27
2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija (MAE) 28
2.4. METODA ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA 28
2.5. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI 29
2.5.1. FRAP metoda 29
2.5.2. ORAC metoda 30
2.5.3. DPPH metoda 31
3. **REZULTATI I RASPRAVA** 33
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola 33
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti 35
4. ZAKLJUČAK **40**
5. LITERATURA **41**

UVOD

U posljednje vrijeme prirodni antioksidansi su sve češći predmet brojnih istraživanja kako bi se pronašli spojevi koji štite od bolesti povezanih s oksidacijskim stresom i oštećenjima izazvanim slobodnim radikalima. Oksidacijski stres pridonosi razvoju bolesti kao što su ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, rak, dijabetes, upalne bolesti, kao i procesi starenja. Antioksidansi mogu odgoditi, inhibirati ili spriječiti oksidaciju oksidirajućih materijala uklanjanjem slobodnih radikala i smanjenjem oksidacijskog stresa. U biljnom carstvu se mogu naći razni spojevi koji pokazuju antioksidacijske aktivnosti. Među njima posebno se ističu polifenoli, koji se smatraju izvrsnim prirodnim antioksidansima.

Borovica (*Juniperus communis* L.) sadrži širok spektar spojeva koji pokazuju biološku aktivnost i zbog toga su zanimljivi za fitokemijska ispitivanja. Važan je izvor kumarina,flavonoida,lignana,sterola,terpenoida,alifatskih i aromatskih spojeva. Znanstvenim istraživanjima dokazano je njeno antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje, zbog čega je sve zanimljivija znanstvenicima, ali i potrošačima. Danas su vrste borovice i njihova esencijalna ulja prepoznati u službenim farmakopejama Austrije i Švicarske, kao i Europske farmakopeje.

U ovom radu određen je udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata crvenih i zelenih plodova borovice te iglica borovice. Provedene su dvije različite metode ekstrakcije, ultrazvučna i mikrovalna.Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom, dok se antioksidacijska aktivnost mjerila FRAP, ORAC i DPPH metodama.

1. OPĆI DIO

1.1. Borovica

Borovica (*Juniperus communis* L.) je zimzeleni grm ili niže stablo iz porodice čempresovki (*Cupressaceae*) koje obično dosegne visinu od 1 do 2m (iznimno i do 12m).Ime *Juniperus* potječe od latinske riječi *juvenis* (rano, mlad) i *parus* (rađati), a vrsta *communis* znači običan, uobičajen. Grane borovice su uzdignute ili viseće, nisu u pršljenima. Mlada kora je crvenkaste do smeđe boje,dok je ona starija sivosmeđa, izbrazdana i ljušti se. Pupovi su zelene ili smeđe boje, prekriveni bodljikavim ljuskama. Listovi borovice su bodljikavi i igličasti, dužine od 1 do 2 cm. Kod borovice postoje muški i ženski cvjetovi. Muški cvjetovi su jajasti i svijetlo-žute boje, usmjereni prema gore i rastu po 2-3 u pazušcima prošlogodišnjih iglica, dok su ženski cvjetovi zeleni, uspravni i rastu pojedinačno. Plodovi borovice se nalaze na vrlo kratkim stapkama, kuglasti su i promjera od 4 do 9 mm. Beru se od početka jeseni sve do zime, što obično ovisi o nadmorskoj visini na kojoj biljka raste. Svaki plod sadrži po tri duguljaste, smeđe sjemenke. Dozrijevanje plodova traje dvije godine kada iz zelene boje prelaze u tamnoplavu. Borovicu se može naćina području Europe, Azije, Sjeverne Afrike i Sjeverne Amerike. U našim krajevima raste na zapuštenim, neobrađenim mjestima, po osunčanim borovim i brezovim šumama, niskim šikarama, ogoljenim i kamenitim mjestima. Acidofilna tla pogoduju rastu borovice. Razmnožava se na dva načina, sjemenom i vegetativno (reznicama). Sporo raste, ali može doživjeti veliku starost. Otporna je na nepogodne klimatske uvjete, dobro podnosi sušu i jaki mraz. Cvate u travnju i svibnju sitnim dvodomnim cvjetovima (iznimno jednodomna), dok se plodovi (bobice) skupljaju u jesen. S obzirom na to da bodljikave iglice otežavaju berbu ispod biljke se obično rasprostre pokrivač te se bobice otresu štapom i potom sakupe. Suše se na hladnom, suhom i prozračnom mjestu, dok je za pravilno čuvanje potrebno plodove staviti u zatvorenu posudu i pohraniti na tamnom mjestu (1,2).



Slika 1. Borovica (*Juniperus communis*) (3)



Slika 2. Stanište borovice (4)

1.2. Kemijski sastav

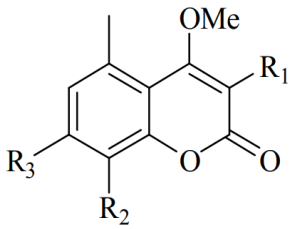
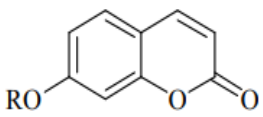
Podaci iz 2005. godine koje su objavili Seca i Silva govore o tome da je u razdoblju od 35 godina (od 1970. do 2004.) istraženo 27 vrsta i 13 sorti borovice, te izolirano gotovo 580 spojeva koji imaju široku biološku aktivnost i zbog toga su zanimljivi za fitokemijska ispitivanja (5).

Seca i Silva su identificirali najčešće prisutne spojeve u vrstama borovice, koji ne spadaju u sastojke eteričnih ulja, a to su: kumarini, flavonoidi, lignani, steroli, terpenoidite alifatski i aromatski spojevi (5).

1.2.1. Kumarini

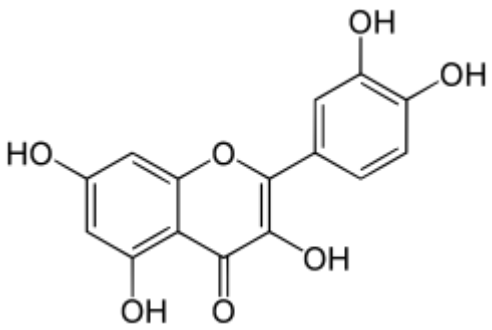
Iz osam vrsta borovice izolirano je šest kumarina (5).

Tablica 1. Kumarini izolirani iz borovice (5)

Struktura	Ime	Vrste
	4-metoksi-5-metilkumarin	*J. semiglobosa Regel*
	siderin	*J. sabina* L. *J. semiglobosa Regel*
	kumarsabin	*J. sabina* L.
	8-metoksi-kumarsabin	*J. sabina* L.
	umbeliferon	*J. chinensis* L. *var. kaizuka Hort.* *J. communis* L. *J. drupacea Labill* *J. oxycedrus* L. *var. macrocarpa (Sm.) Ball* *J. rigida Sieb. et Zucc.* *J. semiglobosa Regel*
	skimin	*J. phoenicea* L.

1.2.2.Flavonoidi

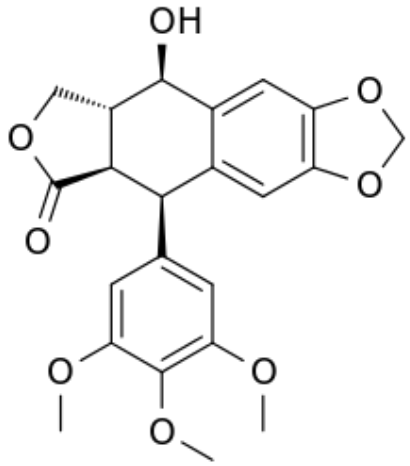
Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu polifenolnih spojeva s više od 8000 izoliranih i opisanih spojeva, a smatraju se i najrasprostranjenijim biljnim sekundarnim metabolitima vrlo raznolikih struktura. Osnovnu strukturu flavonoida čine dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem (C6-C3-C6) koji uglavnom s atomom kisika čini piranski prsten. Kod vrsta borovice identificirano je preko šezdeset flavonoida, uglavnom s biflavonolom i derivatima flavona, od kojih su najznačajniji apigenin, luteolin, kvercetin, izokvercetin, rutin, nepetin, naringenin, iridin, irigenin, (+)-katehin, (-)-epikatehin i dr. (5,6).



Slika 3. Struktura kvercetina (7)

1.2.3. Lignani

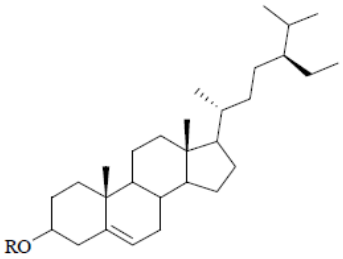
Iz vrsta borovice izolirano je također preko šezdeset lignana. Jedan od tih lignana je podofilotoksin koji se nalazi u malim količinama u vrstama borovice, koji pokazuje jaku antileukemijsku aktivnost. Također neki od njih pokazuju citotoksičnu aktivnost, što opravdava njihovu uporabu u tradicionalnoj medicini (5).



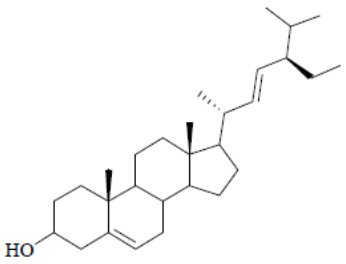
Slika 4. Struktura podofilotoksina (8)

1.2.4. Steroli

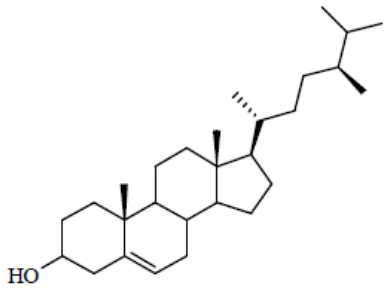
Samo su četiri vrste sterola izolirane iz vrsta borovice, a najzastupljeniji među njima je sitosterol (slika 5) (5).



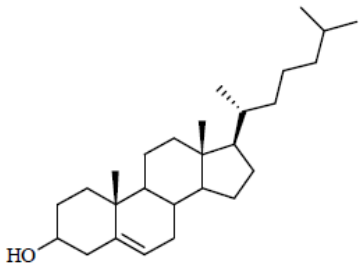
Slika 5. Sitosterol (9)



Slika 6. Stigmasterol (9)



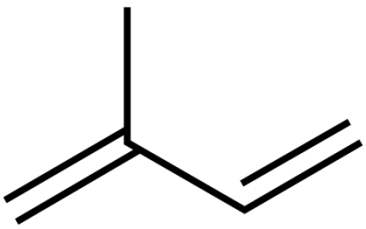
Slika 7. Kampesterol (9)



Slika 8. Kolesterol (9)

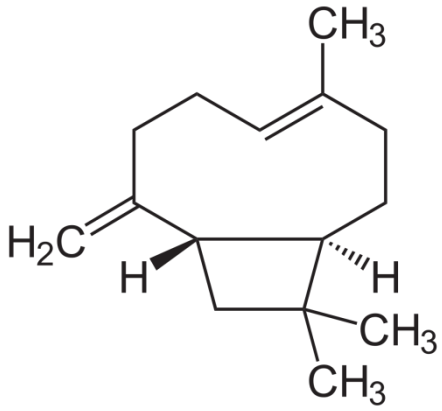
1.2.5. Terpenoidi

Terpenoidi, poznati i kao izoprenoidi, strukturno su vrlo različiti prirodni spojevi. Osnovna građevna jedinica terpenoida je izopren, a ovi spojevi se klasificiraju temeljem broja i strukturne organizacije ugljika formiranih linearnim rasporedom izoprenskih jedinica, nakon čega slijedi ciklizacija i preuređivanje ugljičnog kostura s empirijskim obilježjem poznato kao pravilo izoprena (9).



Slika 9. Struktura izoprena (10)

Brojni seskviterpenoidi su izolirani iz vrsta borovice, aneki od značajnijih su α-, β-, γ-, δ-akoradien, α-, β-akorenol, kadalen, α-, γ-, δ-, T-kanidol, β-kariofilen i drugi (5).



Slika 10. Struktura β-kariofilena (11)

Kod pripadnica roda borovice izolirani su biciklički diterpeni, uglavnom labdanskog tipa, a neki od njih pronađeni u vrstama borovice su: imbrikatolna kiselina, metil imbrikatolat, imbrikatalna kiselina, junicedral, izokupresna kiselina, agatska kiselina itd. Veliki broj tricikličnih diterpenoida identificirano je iz vrsta borovice: izopiramična kiselina, izopiramal, izopiramol, kriptojaponol, sugiol i dr. (5).

1.2.6. Alifatski i aromatski spojevi

Iz vrsta borovice izolirani su i alifatski i aromatski spojevi. Među najzastupljenijim alifatskim spojevima su nonakozan, 10-nonakozanol, kaprilna, laurinska, palmitinska, miristinska, stearinska, oleinska, dokozanojska, palmitoleinska, arahidinska, linolna i linolenska kiselina, glicerol, skvalen i dr. Identificirani aromatski spojevi su cinamil izovalerijat, benzil benzoat, emodin, procerin i dr. (5).

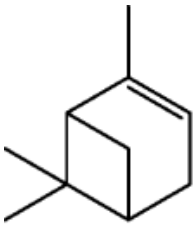
1.3. Upotreba borovice

Borovica se konzumira od davnina diljem svijeta za razne svrhe u tradicionalnoj medicini. U Litvi, Poljskoj i drugim zemljama baltičke regije grančice borovice korištene su za blagoslov tijekom Cvjetnice jer se vjerovalo da štite kuće od grmljavine i zla te usjeve protiv pljuskova, tuče, suše i glodavaca. U stara vremena grančice bi se dodavale u polje radi dobrog uroda ili bi se stavljale u košnice za zaštitu pčela od bolesti. Grane i plodovi borovice spaljivane su u hramovima radi pročišćavanja zraka tijekom vjerskih ceremonija. Mistične potencije koje su se pripisivale borovici bile su povezane s jakim dezinfekcijskim svojstvima ove vrste koja su uočena davno. Plodovi se koriste u tradicionalnoj turskoj medicini kao diuretik, antiseptik i za liječenje gastrointestinalnih problema. Zapadna američka plemena bi od borovice u kombinaciji sa žutikom pripravljala biljni čaj. U Rumunjskoj se plodovi borovice tradicionalno koriste kao infuzija ili tinktura iznutra za diuretičko i antiseptičko djelovanje, a izvana za razna dermatološka stanja. Danas su vrste borovice i njihova esencijalna ulja prepoznati u službenim farmakopejama Austrije i Švicarske, kao i Europske farmakopeje. Eteričnom ulju borovice pripisuju se antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antioksidacijska i protuupalna svojstva. Zbog toga se koristi u farmaciji za liječenje prehlade ili kao bakterijski i gljivični antiseptik (12). Nedavna istraživanja također su otkrila citotoksični, hipoglikemijski i hipolipidemijski učinak borovice u eksperimentalnim modelima. Razne znanstvene studije (*in vivo, in vitro* i kliničke studije) uključene su za potvrđivanje različitih farmakoloških aktivnosti biljke što će opravdati njegovu moguću medicinsku upotrebu kod ljudi i u veterini (13). Li i sur.u svojoj studiji su otkrili da α-pinen, linalol i 1-oktanol pridonose lokalnoj protuupalnoj i analgetičkoj aktivnosti inhibiranjem aktivnosti ciklooksigenaze-2 (14).

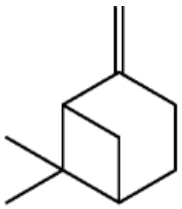


Slika 11. Eterično ulje borovice (15)

U prehrambene svrhe uglavnom se koriste plodovi borovice, dok je upotreba grančica rjeđa. Aroma đina vjerojatno je najpoznatija kulinarska upotreba borovice. Ime đin potječe od genièvre (francuski), jenever (nizozemski) i ginepro (talijanski), a značenje njih svih je borovica. Borovice su se povremeno koristile za izradu vina i likera u Poljskoj, dok se u Estoniji u trgovinama sa zdravom hranom prodaje sirup proizveden od borovice. Primjenjuje se i u izradi umaka, nadjeva, marinada i kao začin. Za prepoznatljiva aromatična svojstva eteričnog ulja borovice zaslužni su terpeni, osobito monoterpenski α-pinen koji može dominirati u ulju s čak 90%. Njegov izomer, β-pinen, je zastupljen u znatno nižoj količini. Terpeni, koji su dominantni sastojci ulja borovice, nisu učinkovita antimikrobna sredstva kad se testiraju pojedinačno. Tako su eksperimenti *in vitro* pokazali da α-pinen, β-pinen, (+)-sabinen, γ-terpineni, β-mirceni i limoneni pokazuju ili pokazuju izrazito slabo antimikrobno djelovanje protiv bakterija koje kvare hranu kao što su *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*. Eterično ulje borovice se koristi i kao konzervans mesa jer usporava oksidaciju lipida i tako produljuje rok trajanja proizvoda. Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja borovice ovisi ne samo o glavnim sastojcima, već i o interakciji između glavnih i sporednih sastojaka. Primjerice, pokazalo se da kombinacija eteričnog ulja borovice i kadulje, α-pinen i linalool rezultiraju sinergističkim učincima u ispitivanjima sa *S. cerevisiae* i *Geotrichumcandidum*. Izgaranjem iglica borovice nastaje dim koji se koristi za dimljenje mesa i riba od davnina. Osušeni i zdrobljeni plodovi koriste se kao začin i poboljšivač okusa i arome mesa, juha, nadjeva, variva, umaka i ukiseljene hrane (12).



Slika 12. α-pinen (16)



Slika 13. β-pinen (16)

1.4. Biološki učinci borovice

1.4.1. Antimikrobni učinak borovice

Razna eterična ulja i njihovi sastojci pronalaze primjenu kao antimikrobna sredstva u farmaciji, u konzerviranju hrane ili kliničkoj mikrobiologiji. Jedno od takvih ulja sa snažnim antibakterijskim i antifungalnim djelovanjem je eterično ulje borovice. Sadržaj eteričnog ulja u plodovima borovice kreće se od 0,5 do 2,5%, a njegovi glavni spojevi su terpenski ugljikovodici poput α- i β-pinena, mircen, sabinen, tujon, limonen itd. Ulje sadrži i seskviterpenske ugljikovodike (kariofilen, kadinen, elemene) i terpenski alkohol (terpinen-4-ol) (17).

Pepeljnjak i sur. istraživali su antimikrobnu aktivnost esencijalnog ulja iz plodova borovice protiv nekih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta i protiv gljivica. Ispitivano je šesnaest vrsta bakterija, sedam kvasaca te četiri vrste dermatofita. Studija je pokazala antimikrobni učinak ulja protiv svih osam ispitanih Gram-pozitivnih sojeva bakterija (*B. cereus, B. subtilis, Micrococcus flavus, Micrococcus luteus, S. aureus, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis*) i šest od osam ispitanih Gram-negativnih sojeva bakterija (*Serratia* spp., *Salmonella enteritidis, Proteus mirabilis, Shigella sonnei, Klebsiella oxytoca, Yersinia enterocolitica*). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) bila je između 8 i 70%. Dokazan je i snažni antifungalni učinak s MIK vrijednostima ispod 10% (V/V). Najjača antifungalna aktivnost uočena je na vrste roda *Candida,* s MIK vrijednostima između 0,78 i 2% (V/V) i na dermatofite s MIK vrijednostima između 0,39 i 2% (V/V) (17).

Sati i Joshi ispitivali su osjetljivost pet patogenih bakterijskih vrsta (*Bacillus subtilis, Erwinia chrysanthemi, Escherichia coli, Agrobacterium tumefaciens i Xanthomonas phaseoli*) na ekstrakte lišća (vodeni, metanolni, etanolni, kloroform i heksan) borovice koristeći disk difuzijsku metodu. Utvrdili su osjetljivost bakterijana sve ekstrakte, osim vodenog. Najbolju zonu inhibicije pokazao je ekstrakt heksana, zatim etanolni, metanolni i kloroformski ekstrakt (18).

Nekoliko studija su izvijestile o učinkovitosti borovice u liječenju tuberkuloze. Ekstrakti su pokazali izrazitu učinkovitost prema*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, Mycobacterium aurum* i *Mycobacterium smegmatis.* Iako je nekoliko terpenoida identificirano kao odgovorno za antimikobakterijsko djelovanje, zajedničko antimikobakterijsko djelovanje borovice nikada nije pripisanonijednoj čistoj djelatnoj tvari. Gordiena i sur.proučavali su antibakterijsku aktivnost terpenoida borovice, i u svojim testovima antituberkularnu aktivnost korijena borovice dodijelili su seskviterpenu longifolenu i diterpenu totarolu (19).

1.4.2. Antioksidacijski učinak borovice

U posljednje vrijeme sve se više proučavaju prirodni antioksidansi kako bi se pronašli spojevi koji štite od brojnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom i oštećenjima izazvanim slobodnim radikalima. Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža u oksido-redukcijskim reakcijama pri čemu se stvaraju povećane količine slobodnih radikala i razvoja brojnih bolesti (ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, rak, dijabetes, upalne bolesti, starenje). Ova neravnoteža dovodi do oštećenja važnih biomolekula (proteini, lipidi, ugljikohidrati i DNA) i organa s potencijalnim štetnim utjecajem na cijeli organizam. Antioksidansi mogu odgoditi, inhibirati ili spriječiti oksidaciju oksidirajućih materijala uklanjanjem slobodnih radikala i smanjenjem oksidacijskog stresa. Biljno carstvo nudi širok spektar spojeva koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Polifenoli se smatraju izvrsnim prirodnim antioksidansima (20).

Mehanizmi putem kojih polifenoli ostvaruju svoje antioksidacijsko djelovanje i na taj način sprječavaju oštećenja biomolekula su sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, sprječavanje njihovog nastajanja putem keliranja metalnih iona, redukcijska sposobnost, inhibicija lipidne peroksidacije, regulacija obrambenih enzima i djelovanja na stanične signalne puteve i ekspresiju gena (20).

Emami i sur. istraživali su antioksidacijsku aktivnost eteričnih ulja različitih dijelova borovica *Juniperus communis.* subsp. *hemisphaerica.* i *Juniperus oblonga.* U svojoj studiji određivali su antioksidacijsku aktivnost korištenjem DPPH radikala. Za analizu esencijalnih ulja koristili su GC i GC-MS kako bi identificirali sastojke i utvrdili koje komponente ulja doprinose antioksidacijskom učinku. Svojim testovima utvrdili su antioksidacijsko djelovanje eteričnog ulja, za koje su u najvećoj mjeri zaslužni terpenoidi. Navode dva parametra o kojima treba voditi računa. Prvi je odabir radikalne vrste. Drugi značajan parametar je polaritet otapala korišten u metodi. Eterična ulja i njihovi čisti spojevi nisu topljivi u polarnim otapalima. Stoga u takvim otapalima ne mogu pokazati vrlo jak antioksidacijski efekt (21).

Höferl i sur.u svom su *in vitro* antioksidacijskom istraživanju eteričnog ulja borovice dokazali postojanje nekoliko mehanizama mogućeg uklanjanja radikala i sprečavanje stvaranja radikala (kelatna sposobnost, inhibitorni učinak na ksantin oksidazu) i zaštitu od peroksidacije lipida. Nadalje, *in vivo* studije potvrdile su ove učinke ulja što je stvorilo mogućnost blokiranja oksidacijskih procesa u stanicama kvasaca i povećali njihovu prilagodljivost na reaktivne kisikove spojeve (ROS). Dobro je poznato da ROS doprinose starenju organizma i razvoju raznih bolesti. Dokazana sposobnost eteričnogulja borovice za poboljšanje prilagodljivosti na ROS određuje njegov potencijal za proizvodnju aditiva za hranu (22).

Šojić i sur. u svojoj studiji su ispitivali antioksidacijski učinak eteričnog ulja borovice u kuhanim svinjskim kobasicama. Glavni uzrok kvarenja kobasica je oksidacija lipida, koja uzrokuje promjenu boje, mirisa, okusa, teksture i smanjuje nutritivnu vrijednost proizvoda. Eterično ulje borovice, u koncentraciji od 0,01 µl/g, smanjuje formiranje radikala i rast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija i poboljšava boju kuhane kobasice, s laganim do umjerenim izmjenama izvornog okusa kuhanih kobasica (23).

1.4.3. Ostale aktivnosti

Šećerna bolest ili dijabetes je kronična bolest koja se javlja bilo kada gušterača ne proizvodi dovoljno inzulina ili kada tijelo ne može učinkovito koristiti proizvedeni inzulin. Mnoge su istraživačke skupine izvršile *in vitro* i *in vivo* studije koje su dokazale antidijabetičku i hipoglikemijsku aktivnost borovice. Plodovi borovice koriste se u patentiranom biljnom pripravku nazvanom Antidijabetis s devet drugih ljekovitih biljaka na hrvatskom tržištu kao antihiperglikemijska biljka (24).

Petlevski i sur. proučavali su učinak borovice na miševe s dijabetesom. Na kraju eksperimenta razina glukoze u krvi je pala. Osim izravnog smanjenja razine glukoze u krvi, borovica ima utjecaj na homeostazu glukoze u krvi različitim mehanizmima kao što su povećavanje *in vitro* lučenja inzulina, povišenje razine cinka, inhibiranje α-amilaze, α-glukozidaze i gušteračinih lipaza (25).

Banerjee i sur. ispitivali su utjecaj metanolnog ekstrakta borovice kod štakora s dijabetesom i zabilježili značajno smanjenje razine glukoze u krvi, ukupnog kolesterola, triglicerida, lipoproteina male gustoće (LDL), lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL) s povišenjem razine lipoproteina visoke gustoće (HDL) (26).

Bais i sur. dokazali su da ekstrakti borovice imaju zaštitni učinak na živce i poboljšavaju pamćenje kod izloženih životinja. Prema tome može biti potencijalno alternativno liječenje Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti i ostalih kroničnih neuroloških poremećaja (27). Druga studija koja potvrđuje neuroprotektivni učinak borovice je studija Cioanca i sur. koja utvrđuje da udisanje hlapljivih ulja borovice inhibira aktivnost acetilkolinesteraze i sprječava oksidacijsko oštećenje mozga glodavaca (28).

Manvi i sur. dokazali su hepatoprotektivnu aktivnost borovice na hepatotoksičnom modelu izazvanim ugljik tetrakloridom (29). Singh i sur. dokazali su blagotvorno djelovanje etanolnog ekstrakta borovice tijekom 14 dana uzimanja na toksičnost jetre koja je izazvana istodobnom primjenom paracetamola i azitromicina (30). Fierascu i sur. u svojoj studiji daju izvještaj da je vodeno-alkoholni ekstrakt borovice učinkovit kao antimikotik protiv *Aspergillus niger* i *Penicillium hirsutum* i takva aktivnost može se pripisati fitokemijskim sadržajem, uglavnom polifenolima

(31).Yaglioglu i sur. proveli su istraživanje na četiri vrste borovice (*Juniperus oxycedrus ssp. oksidedrus, J. foetidissima, J. excelsa* i *J. communis*) u pogledu fenolnog profila i antiproliferativne aktivnosti. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se iglice vrsta borovice mogu procijeniti kao izvor prirodnih spojeva s antiproliferativnim djelovanjem, koje bi mogle biti prikladne za primjenu u medicinske svrhe (32).

1.5. Ekstrakcija

Biljni ekstrakti su naširoko korišteni u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji jer sadrže širok spektar bioaktivnih spojeva, za čiju izolaciju iz biljakase primjenjuju razne ekstrakcijske metode (33). Ekstrakcija se definira kao učinkovita i brza metoda odjeljivanja i koncentriranja tvari. Razdvajanje tvari u homogenim smjesama se zasniva na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Kako bi se tvar dobivena ekstrakcijom izdvojila u čistom obliku potrebno je dobivenu otopinu otpariti ili kristalizirati (34). Općenito je poznato da uspješnost ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, pH vrijednosti, vremenu ekstrakcije, temperaturi te samom kemijskom sastavu i fizikalnim obilježjima uzorka. Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju su metanol, etanol, aceton, etil acetat te voda (35). Najkorištenije konvencionalne metode ekstrakcije su (34):

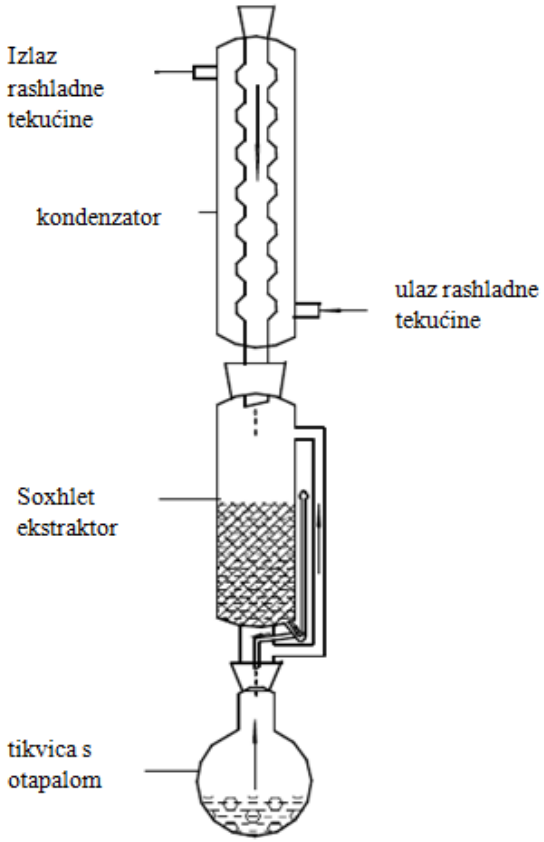
1. Destilacija: direktna destilacija, destilacija vodenom parom ili vodom i parom

2. Ekstrakcija otapalima: ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima

3. Hladno prešanje.

Također posljednjih godina koriste se i nekonvencionalne tehnike kao što su ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija mikrovalovima.

Cilj svakog postupka ekstrakcije čvrstih tvari je povećati površinu međudjelovanja među fazama (usitnjavanjem). U svrhu povećanja učinkovitosti ekstrakcije obično se treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije. Ekstrakcija ciljane tvari iz čvrste faze može se provoditi pri sobnoj temperaturi (maceriranje, perkoliranje) ili pri povišenoj temperaturi kada se obično izvodi zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom. Druga najčešća tehnika ekstrakcije pri povišenoj temperaturi se izvodi u Soxhlet aparatu (34).

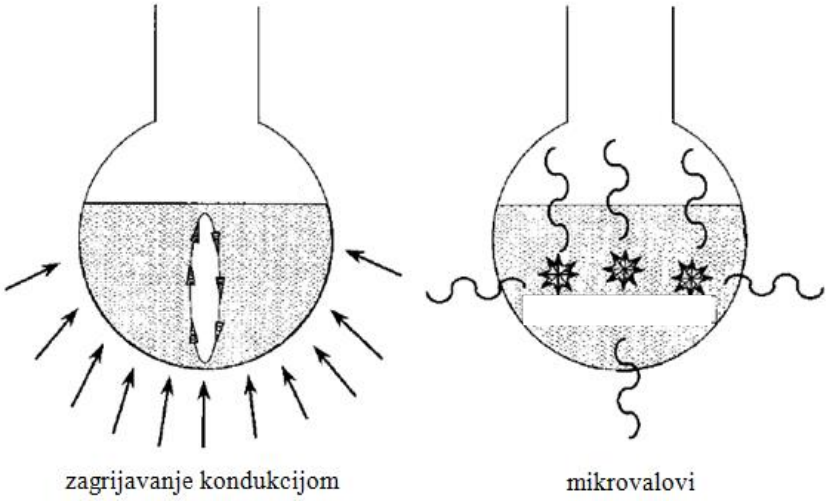


Slika 14. Eksperimentalni Soxhletov aparat za ekstrakciju (33)

Razlikuju se kontinuirana i diskontinuirana ekstrakcija, jednostupanjska, višestupanjska, višestupanjska protustrujnai ekstrakcija unakrsnim kontaktom s jednim otapalom (34). Ponekad konvencionalne metode ekstrakcije mogu biti nedovoljne i spore, zahtijevaju velike količine organskih otapala te mogu uzrokovati razgradnju toplinski labilnih sastojaka. Zbog sve većeg interesa za izolacijom specifičnih komponenti posljednjih godina su se razvile brojne nove tehnike ekstrakcije od kojih su najznačajnije ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Ove tehnike su omogućile automatizaciju procesa, znatno skratile vrijeme ekstrakcije, smanjile potrošnju organskih otapala i što je najvažnije povećale učinkovitost ekstrakcije (36,37).

1.5.1. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koji se javljaju pri frekvenciji od 300 MHz do 300 GHz (33).Mikrovalovi pronalaze svoju primjenu u prehrambenoj industriji, za pečenje, zagrijavanje, sušenje, odmrzavanje, blanširanje i dehidraciju.Također se mogu koristiti i u svrhu inaktivacije mikroorganizama i u procesima konzerviranja, kao što su pasterizacija i sterilizacija. Zbog svog ograničenog energetskog potencijala mikrovalovi ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, njihove molekule titraju i međusobno se dodiruju što rezultira samim porastom temperature. Upravo taj efekt je iskorišten u mikrovalnim pećnicama za kuhanje i sušenje (34).Mikrovalne pećnice posjeduju električno i magnetsko polje, koja su međusobno okomita i u fazi. Konvencionalno grijanje ovisi o kondukciji i konvekciji te se s vremenom veliki dio toplinske energije gubi u okoliš. U slučaju mikrovalnog zagrijavanja se pak zagrijavanje događa ciljano i selektivno u zatvorenom sustavu pa se toplina ne gubi u okoliš. Mikrovalovi ne prenose toplinu, već energiju, a toplina nastaje kao rezultat interakcije valova s medijom (38).



Slika 15. Usporedba konvencionalnog zagrijavanja kondukcijom i mikrovalovima (39)

Mikrovalna ekstrakcija je nova analitička metoda ekstrakcije koja se koristi za tretiranje i procesiranje raznih prehrambenih proizvoda, ali također i za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz različitih biljnih materijala (34,37). Mikrovalovi djeluju na način da zagrijavaju cijeli uzorak istovremeno i pucaju vodikove veze uzrokujući rotaciju dipola. Nadalje, migracija otopljenih iona pospješuje prodiranje otapala u matriks i na taj način potiče ekstrakciju. Obzirom da su ionske struje u otopini inducirane električnim poljem, a kako se medij opire tim strujama, dolazi do trenja i oslobađanja topline, što je poznato i kao Jouleov efekt koji ovisi o veličini i naboju iona prisutnih u otopini (39). Mikrovalna ekstrakcija određena je snagom i frekvencijom mikrovalova, trajanjem mikrovalne radijacije, količinom vlage i veličinom čestica u uzorku, tlakom i brojem ekstrakcijskih ponavljanja (33).

Prednosti mikrovalne ekstrakcije nad konvencionalnim metodama su (38):

1) Značajno smanjenje trajanja ekstrakcije (obično u rasponu od nekoliko sekundi do nekoliko minuta).

2) Smanjena upotreba otapala (potrebno je samo nekoliko mililitara otapala).

3) Poboljšani prinos.

4) Automatizacija procesa koja omogućuje bolju točnost i preciznost.

5) Pogodna je za termolabilne sastojke.

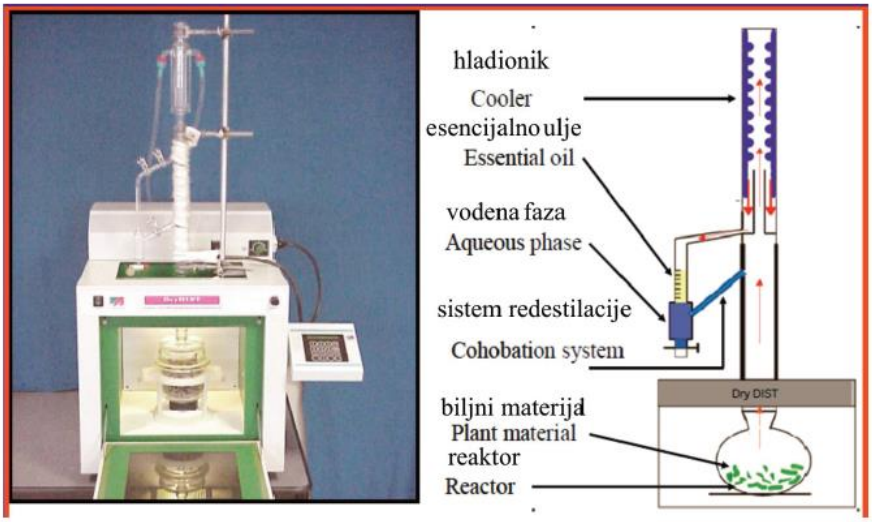
6) Mogućnost ekstrakcije sastojaka i u tragovima, uključujući teške metale i ostatke pesticida, iz samo nekoliko miligrama uzorka.

7) Miješanje tijekom postupka ekstrakcije, što poboljšava fenomen prijenosa mase.

8) Uređaj kombinira značajke Soxhleta i prednosti mikrovalne pećnice, čineći ekstrakciju boljom.

Postoji i negativan učinak primjene mikrovalova, a to je povišenje temperature što može negativno utjecati na bioaktivne komponente i kvalitetu ekstrahiranog materijala (34).

Dvije su vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Sustav mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pri niskoj ili visokoj temperaturi ekstrakcije, a tlak u posudi je ovisan o količini i temperaturi vrelišta otapala. Mikrovalna ekstrakcija se primjenjuje za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka, za ekstrakciju različitih prirodnih spojeva, za izdvajanje temperaturno osjetljivih spojeva kao što su eterična ulja, za ekstrakciju nutraceutika, itd. Važni čimbenici koji utječu na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije su veličina i raspodjela čestica, izbor otapala i temperatura. Veličine čestica ekstrahiranih tvari je obično u rasponu od 100 μm do 2 mm. Pri odabiru otapala treba voditi računa o topljivosti željenog ekstrakta, interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom. Odabrano otapalo trebalo bi posjedovati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova. Drugi važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju je temperatura. Općenito, povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom, ali treba voditi računa o termolabilnim spojevima koji se pri visokim temperaturama mogu razgraditi (34).

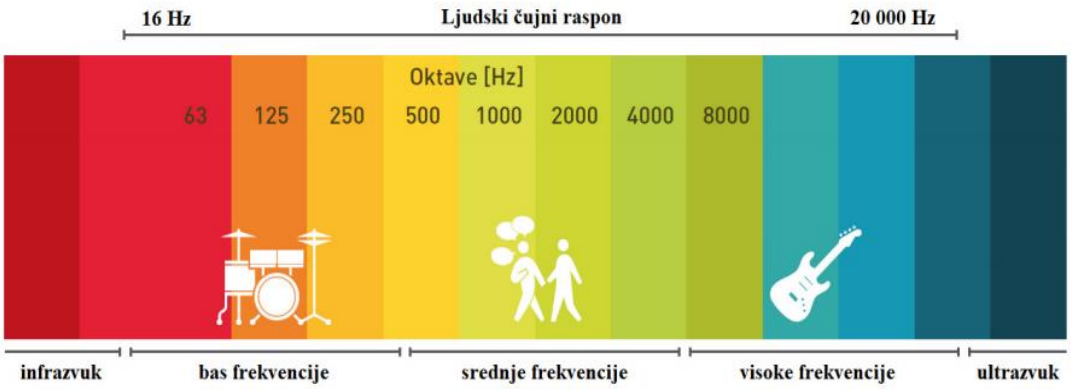


Slika 16. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (34)

1.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija

U današnje vrijeme izazovi s kojima se susreću prehrambeni tehnolozi su razvoj novih prehrambenih i funkcionalnih proizvoda korištenjem tehnika minimalnog procesiranja. Jedna od novijih metoda, alternativa klasičnim toplinskim metodama procesiranja je i primjena ultrazvuka. Dok je ranije primjena ultrazvuka uglavnom bila ograničena na čišćenje i procese emulgiranja, danas se ultrazvuk koristi u različitim područjima u industriji (40).

Ultrazvuk uključuje primjenu zvučnih valova s frekvencijama višim od praga osjetljivosti ljudskog sluha pri čemu se prenose impuls i energija, bez prijenosa mase (41).

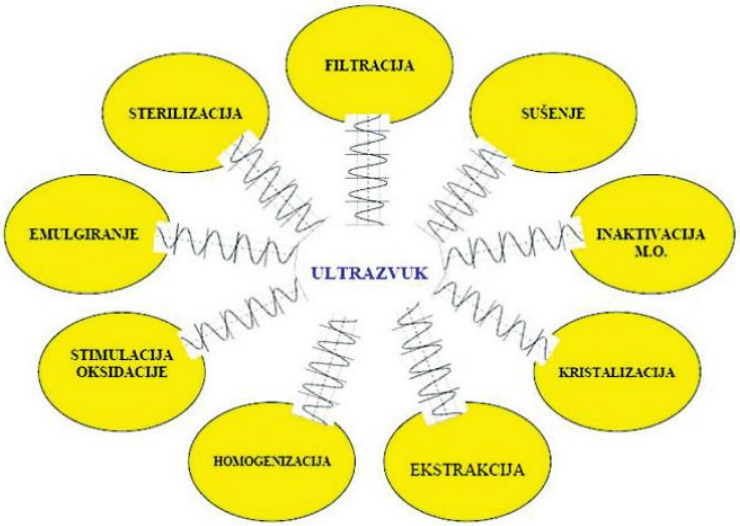


Slika 17. Frekvencijski spektar koji čuje ljudsko uho (42)

Razlikuju se:

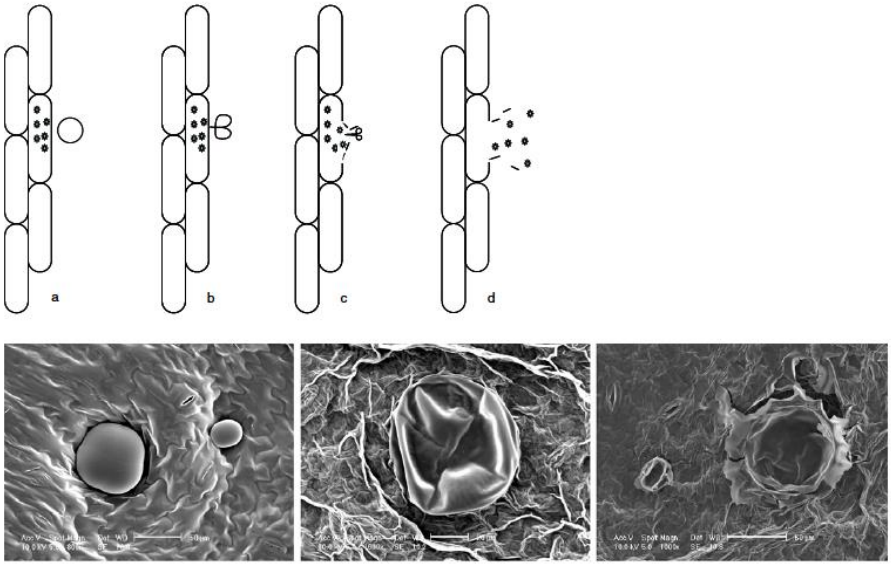
- *ultrazvučni valovi niskog intenziteta* (dijagnostički ultrazvuk) koje karakterizira visoka frekvencija (1 do 10 MHz) i niska razina snage (manje od 1 W/cm^2). Prednost dijagnostičkog ultrazvuka je što ne dovodi do fizikalnih ili kemijskih promjen amaterijala kroz koji prolaze. U prehrambenoj industriji ova vrsta ultrazvučnih valova se koristi za kontrolu procesiranja hrane, kvalitete, protoka tekućine i punjenja spremnika, detektiranje stranih tijela, procjene učinkovitosti procesa homogenizacije i/ili emulgiranja te u svrhu određivanja sastava, strukture ili viskoznosti hrane.

- *ultrazvučni valovi visokog intenziteta* (ultrazvuk visoke energije) koje karakterizira niska frekvencija (20 do 100 kHz) i visoka razine snage (u rasponu od 10 do 1000 W/cm^2). Zbog velike snage pri prolazu kroz materijal ovi valovi uzrokuju fizikalna oštećenja materijala i dovode do ubrzanja određenih kemijskih reakcija u materijalu. U prehrambenoj industriji koriste se za stvaranje emulzije, inaktivaciju mikroba i enzima, mikrobnu dekontaminaciju i čišćenje površina, prijenos mase (ekstrakcija, procesi sušenja/dehidracije, mariniranje i kiseljenje), prijenos energije (grijanje, smrzavanje, odmrzavanje), a mogu se koristiti kao metoda ne-toplinske obrade hrane budući da uzrokuju uništenje enzima i mikroorganizama. (40,43).



Slika 18. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji (44)

Tijekom prolaska zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi pri čemu se stvaraju izmjenični ciklusi kontrakcije i ekspanzije te ekspanzijski vrtlozi. U tekućini se stvara negativan tlak zbog djelovanja ekspanzijskih vrtloga te nastaju mjehurići, što je poznato kao kavitacija. Kavitacija uzrokuje mikrostrujanja što dovodi do povećanja prijenosa mase i topline i nastajanja „vruće točke“ koja ubrzava kemijsku reakciju u mediju. Kada se mjehurići uruše na površini čvrstog materijala, visoka temperatura i tlak oslobađaju generirane mikromlaznice usmjerene prema površini. Mikromlaznice su odgovorne za ekstrakciju biljnih spojeva jer omogućuju poboljšano prodiranje otapala u tijelo biljke i također omogućuju razgradnju stanične stjenke. Učinak ultrazvuka pri procesiranju hrane ovisi o broju mjehurića koji podliježu kavitaciji te o jačini njihove implozije. Za stvaranje kavitacije najvažniji faktori su frekvencija, intenzitet ultrazvuka, viskoznost medija, gustoća, površinska napetost medija, prisutnost otopljenih plinova, temperatura itd. Intenzitet kavitacije uvelike ovisi o koligativnim svojstvima tog medija, koji uključuju tlak pare, površinsku napetost, viskozitet i gustoću, kao i bilo kojem drugom svojstvu koje se odnosi na broj atoma, iona, molekula u mediju (40,45).



Slika 19. Pucanje kavitacijskog mjehura i oslobađanje biljnog materijala: primjer ekstrakcije esencijalnog ulja iz bosiljka (46)

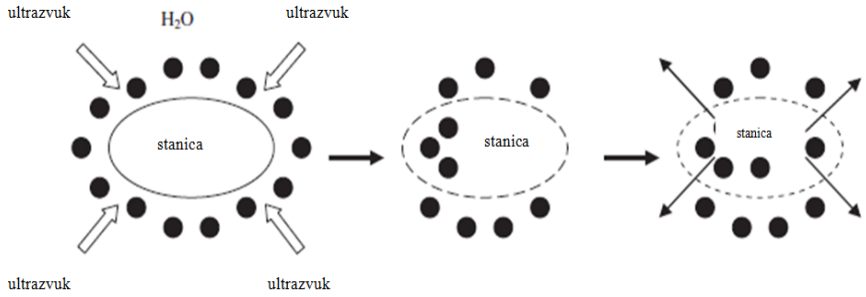
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jeftina, jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Glavne prednosti upotrebe ultrazvuka su povećanje prinosa ekstrakcije i brža kinetika. Razlog tome je kavitacija koja djeluje na stanične stjenke i omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice.

Prijenos mase se odvija u tri koraka:

1. željeni sastojak se otapa u otapalu

2. smjesa otopljene tvari i otapala prelazi iz namirnice na površinu

3. otopljena tvar se raspršuje u volumenu otapala.



Slika 20. Mehanizam oštećenja stanica izazvanih ultrazvukom (46)

Ultrazvučna ekstrakcija se provodi pri nižoj temperaturi i tlaku što omogućuje ekstrakciju termolabilnih spojeva. Nadalje, ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka se može koristiti s bilo kojim otapalom za ekstrakciju raznolikih prirodnih spojeva (33,40). Ultrazvučna ekstrakcija je ekološki prihvatljiva metoda jer je potrebna znatno manja količina otapala (41). Važnost primjene ultrazvučne ekstrakcije u prehrambenoj tehnologiji je od interesa u smislu povećanja ekstrakcije određenih spojeva iz biljnog i životinjskog materijala. Ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom može se povećati prinos određenih komponenti kao što su antioksidansi (47), aromatske tvari, hlapljivi spojevi, eterična ulja, fenolni spojevi (46), proteini, polisaharidi i drugi funkcionalni spojevi (48). U usporedbi s drugim novim tehnikama ekstrakcije kao što je ekstrakcija uz pomoć mikrovalova, ultrazvučni reaktori su jeftiniji i lakši za rukovanje. Postoje razne izvedbe ultrazvučnih sustava, ali za procesno-prehrambenu industriju od posebnog su značaja ultrazvučna kupelj i sustav ultrazvučne sonde. Ultrazvučne kupelji obično se nalaze u kemijskim laboratorijima jer su lako dostupne i jeftine, a najčešće rade na frekvencijama od 20 do 40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području (44).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. BILJNI MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu ovog rada kao biljni materijal korišteni su crveni i zeleni plodovi borovice te iglice borovice ubrane na području Kozjaka tijekom veljače 2020. godine.



Slika 21. Izgled biljnog materijala

2.2. UREĐAJI I KEMIKALIJE

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

Kemikalije:

- Folin- Ciocalteu reagens
- Natrijev fosfat dihidrat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ (*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-AldrichCorporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- Natrijev acetat, $CH_3COONa \times H_2O$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)
- Glacijalna octena kiselina, $C_2H_4O_2$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)
- Klorovodična kiselina, 37% (*Pancreac, Barcelona, Španjolska)*
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) $C_{18}H_{12}N_6$ (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*)
- Željezo (III) klorid, $FeCl_3$(*Kemika, Zagreb, Hrvatska)*
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) $C_{14}H_{18}O_4$,Mr=250,29 g/mol, 97% čistoće (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*)
- Etanol p.a. (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, free radical), $C_{18}H_{22}N_5O_6$ (*Sigma-Aldrich,Steinhem, Njemačka*).

2.3. POSTUPAK EKSTRAKCIJE

Za ekstrakciju se biljni materijal, odnosno crveni i zeleni plodovi borovice te iglice borovice, homogeniziraju u ručnom mikseru do finog praha. Ekstrakcija je provedena korištenjem ultrazvučne kupelji i mikrovalne kako bi se odredila najbolja metoda za najučinkovitiju izolaciju fenolnih spojeva. Kao otapalo korištena je destilirana voda i 50%-tna otopina etanola. Tablica 2. prikazuje oznake za istraživane uzorke, kao i korišteno otapalo te korištenu metodu ekstrakcije.

Tablica 2. Oznake za pripravljene ekstrakte

Oznaka	**Biljni materijal**	**Otapalo**	**Metoda ekstrakcije**
C H2OUZV	crveni plodovi borovice	destilirana voda	UZV
C EtOH UZV	crveni plodovi borovice	50%-tni etanol	UZV
Z H2OUZV	zeleni plodovi borovice	destilirana voda	UZV
Z EtOH UZV	zeleni plodovi borovice	50%-tni etanol	UZV
IGLH2OUZV	iglice borovice	destilirana voda	UZV
IGL EtOH UZV	iglice borovice	50%-tni etanol	UZV
C H2O MAE	crveni plodovi borovice	destilirana voda	MAE
C EtOHMAE	crveni plodovi borovice	50%-tni etanol	MAE
Z H2O MAE	zeleni plodovi borovice	destilirana voda	MAE
Z EtOHMAE	zeleni plodovi borovice	50%-tni etanol	MAE
IGLH2O MAE	iglice borovice	destilirana voda	MAE
IGL EtOHMAE	iglice borovice	50%-tni etanol	MAE

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UZV)

Za pripremu ekstrakata ultrazvukom odvagano je po 50 g usitnjenog biljnog materijala, zatim je u svaku tikvicu dodano 250 ml otapala (u jednu tikvicu destilirana voda, u drugu otopina 50%-tnog etanola). Trajanje ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji iznosilo je 2 sata pri temperaturi od 60 °C na svim uzorcima. Nakon završene ekstrakcije uslijedila je filtracija uzoraka kroz naborani filtar papir nakon čega su prebačeni u *Falcon* epruvete i do trenutka analize čuvani u hladnjaku.

2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija (MAE)

Za pripremu ekstrakata mikrovalovima odvagano je po 100 g usitnjenog biljnog uzorka koji su zatim 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, u trajanju od 4 minute pri temperaturi od 60 °C pri snazi mikrovalova od 600 W na svim uzorcima.Nakon provedene mikrovalne ekstrakcije također je provedena filtracija kroz naborani filtar papir i uzorci su čuvani u *Falcon* epruvetama u hladnjaku.

2.4. METODA ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu koja se temelji na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, pri čemu nastaju plavo obojenje čiji je intenzitet direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u uzorku. Mjerenja se provode na valnoj duljini od 765 nm (49).

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens
- Otopina natrijeva karbonata, w (Na_2CO_3) = 20%
- Matična otopina galne kiseline, c = 5000 mg/L.

Postupak:

U kivetu se otpipetira 25 µl uzorka, doda se 1,5 ml destilirane vode i 125 µl reagens Folin-Ciocalteu. Otopina se promiješa i nakon 1 minute doda se 375 µl 20%-tne otopine natrijevog karbonata Na_2CO_3 te još 475 µl destilirane vode. Otopina se ostavi stajati 2 sata u mraku nakon čega joj se očita apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Dobiveni rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline u litri ekstrakta (mg GAE/L) jer je standardizacija izvršena s galnom kiselinom. Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

2.5. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

2.5.1. FRAP metoda

FRAP (engl.*FerricReducingAntioxidant Power*) metoda je indirektna, brza, ekonomična i jednostavna kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Bazira se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona reduciraju žuto obojeni kompleks željeza(III) sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt Fe^{2+}-TPTZ. Intenzitet nastale plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm (50).

Reagensi:

- Acetatni pufer, c ($C_2H_3NaO_2x3H_2O$) =300 mmol/L, pH=3,6
- Otopina klorovodične kiseline (HCl), c(HCl) = 40 mmol/L
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl, c($C_{18}H_{12}N_6$) = 10 mmol/L
- Otopina željezovog(III) klorida ($FeCl_3$), c(Fe^{3+}) = 20 mmol/L
- FRAP reagens se priprema miješanjem 2,5 mL otopine TPTZ,2,5 mL otopine $FeCl_3$ i 25 mL acetatnog pufera.

Postupak:

U mikrotitarsku pločicu otpipetira se 300 µL svježe pripremljene otopine FRAP reagensa i očita mu se apsorbancija pri 595 nm. Potom se u reagens doda 10 µL uzorka i prati se promjena apsorbancije nakon 4 minute. Promjena apsorbancije izračunava se kao razlika konačne vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese nakon 4 minute i apsorbancije FRAP reagensa prije dodatka uzorka te se uspoređuje s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda. Kao standard je korišten Trolox, a rezultati za FRAP otopinu ekstrakta izraženi su kao µM Trolox ekvivalenti (TE). Sva mjerenja izvršena su u 3 ponavljanja i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

2.5.2. ORAC metoda

ORAC (engl.*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta raznih prehrambenih proizvoda. Temelji se na reakcijskom mehanizmu prijenosa atoma vodika (engl. HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) kojim se mjeri stupanj inhibicije peroksil radikala ($ROO^{\cdot}$). Reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksidnih radikala, fluorescentnu probu (oksidabilni proteinski supstrat) te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. 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 peroksidne radikale. Reakcijom između slobodnih radikala i fluorescentne probe, proba se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, zbog čega dolazi do pada intenziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa u reakcijsku smjesu dolazi do usporavanja ove reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. U testu se kao standardna otopina koristi Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina). ORAC metoda je jedina metoda koja kombinira postotak inhibicije i duljinu vremena inhibicije oksidacije u jednu vrijednost te daje informacije o zaštitnom učinku antioksidansa tijekom dužeg razdoblja (51).

Reagensi:

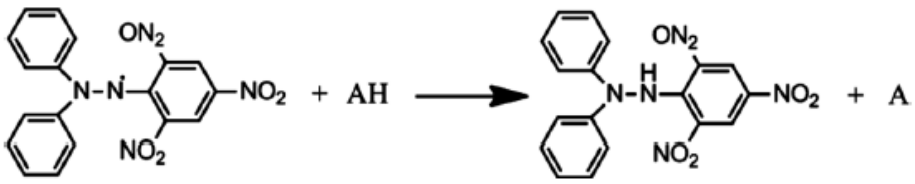
- Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M
- Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M
- Fluorescein: Stock otopina (c=4,2 mM)
- Radna otopina fluoresceina (c=0,8 μM)
- AAPH: 0,207 g AAPH otopi se u 5 ml 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h
- Otopina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

Postupak:

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

2.5.3. DPPH metoda

DPPH metoda je jednostavna, brza i jedna od najčešće korištenih antioksidacijskih metoda koja se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju sposobnosti redukcije DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikala pomoću antioksidansa. DPPH radikal je organski dušikov radikal koji je vremenski stabilan i ljubičasto obojen. Kada DPPH radikal reagira sa spojem koji može donirati vodikov atom ljubičasta boja se gubi, a DPPH radikal se reducira u blijedo žuti hidrazinski oblik. Mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm mjeri se sposobnost antioksidansa da reducira DPPH radikal. Obzirom na postotak obezbojenja DPPH radikala izračunava se antioksidacijski kapacitet uzorka (52,53).



Slika 22. Reakcija antioksidansa i DPPH radikala (53)

Reagensi:

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

Postupak:

U mikrotitarske pločice otpipetira se volumen od 290μL 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 517 nm očita se nakon 1 h. Sve analize, odnosno mjerenja izvršena su u 3 ponavljanja, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost ± SD. Antioksidacijska aktivnost izražena je kao % inhibicije DPPH radikala izračunata prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \{(AC(0) - AA(t))/AC(0)\} \times 100$$

gdje je:

A C(0) – apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod t = 0 minuta

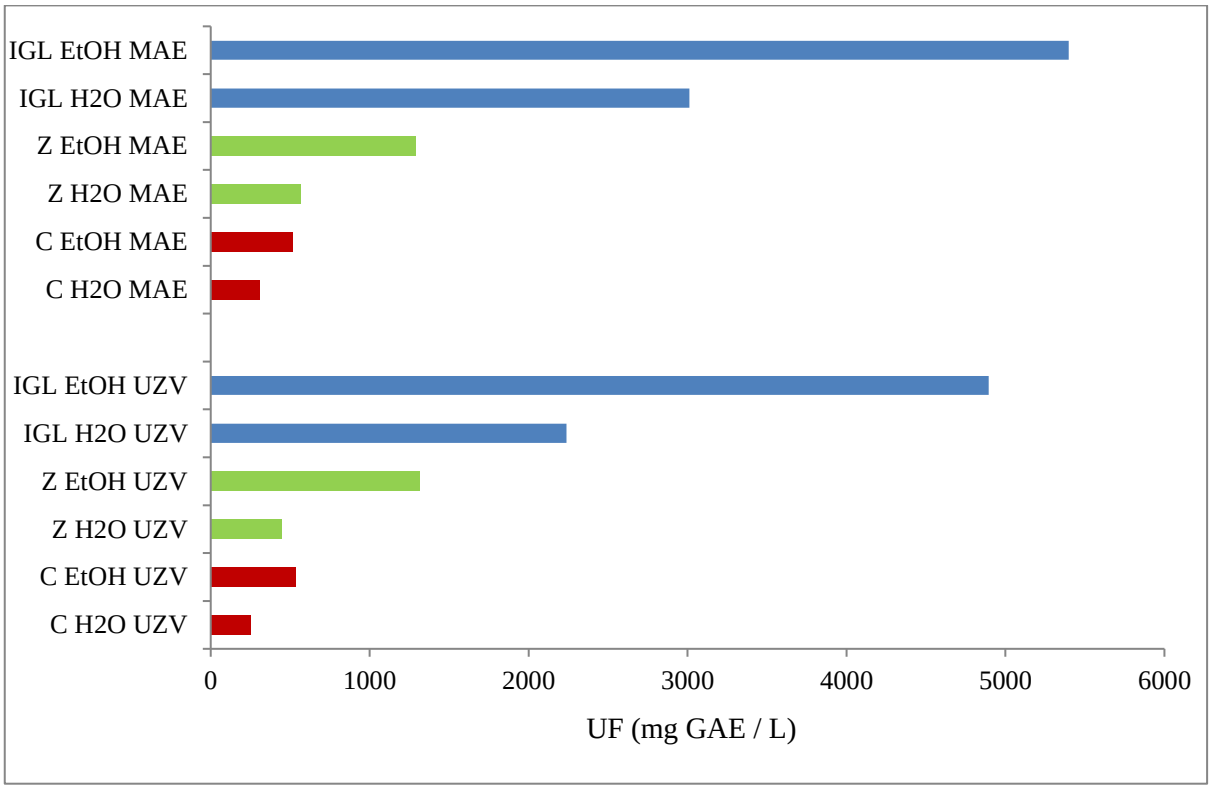
A A(t) – apsorbancija reakcijske smjese nakon 1 h.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Brojne studije naglašavaju utjecaj korištene metode ekstrakcije, kao i primijenjenog otapala (i njegove polarnosti) na razlike u fenolnom sastavu ekstrakata. O borovici postoje brojne studije i analize sastava, no primjena različitih metoda ekstrakcije i korištenih otapala, daje velike razlike u fenolnom sastavu ekstrakata što otežava njihovu usporedbu. U tu svrhu cilj rada bio je odabrati najpovoljniju metodu ekstrakcije i otapala (pri istim eksperimentalnim uvjetima) kako bi se dobio najbolji fenolni prinos iz korištenog biljnog materijala, plodova i iglica borovice.

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola u testiranim ekstraktima borovice prikazani su na slici 23.



Slika 23. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola ekstrakata borovice

Iz grafičkog prikaza može se primijetiti da je najveća količina ukupnih fenola potvrđena u etanolnim ekstraktima borovice u odnosu na vodene ekstrakte pripravljene djelovanjem UZV i MAE. Usporedbom fenolnog prinosa ekstrakata dobivenih UZV i MAE može se uočiti da je MAE u gotovo svim situacijama (iznimka su C EtOH i Z EtOH pripravljeni UZV) u znatno kraćem vremenu trajanja ekstrakcije utjecala na veći prinos ukupnih fenola u odnosu na UZV. Primjenom UZV ekstrakcije u trajanju od 2 sata dobije se udio fenola od 252,7±2,09 do 4894,4±31,5 mg GAE/L, dok je udio ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim MAE bio u rasponu od 311,1± 3,36 do 5397,2± 41,1 mg GAE/L. Znatno veće koncentracije ukupnih fenola pronađene su u ekstraktima iglica borovice, nego li u ekstraktima zelenih i crvenih plodova borovice. Osobito velik udio fenola bio je prisutan u etanolnim ekstraktima iglica borovice (4894 i 5397 mg GAE/L) u odnosu na druge testirane ekstrakte. Od vodenih ekstrakata najveći udio fenola pronađen je u ekstraktu iglica borovice pripravljen MAE ekstrakcijom (3011,1±58,5 mg GAE/L) dok je najsiromašniji bio ekstrakt crvenih plodova borovice pripravljen UZV ekstrakcijom (252,7±2,09 mg GAE/L). Osim vidljivo bogatijeg fenolnog sastava iglica, može se zaključiti da dozrijevanjem plodova udio fenola opada gotovo dvostruko.

Pregledom dostupne literature uočavaju se razlike u sadržaju ukupnih fenola obzirom na korišteno otapalo tijekom ekstrakcije i/ili metode ekstrakcije. Osim toga može se primijetiti da postoji jako velik broj različitih vrsta roda *Juniperus* čiji se predstavnici ispituju.

Modnicki i Łabędzka su istraživali sadržaj fenola u borovici s različitih područja Poljske i sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u svim ispitivanim uzorcima je varirao u granicama od 2,40% do 3,43% (54).

Plećaš je u svom diplomskom radu odredila sadržaj fenola u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus* (*J. communis, J. oxycedrus, J. phoenicea*).Postotak ukupnih polifenola kretao se od 3,01% do 3,92%, a najveći udio ukupnih polifenola sadržavala je vrsta *J. oxycedrus* (3,92%), dok je najniži udio zabilježen u vrsti *J. communis* (3,01%), odnosno u borovicama u gotovo sličnom postotku kao i kod Modnicki i Łabędzka (55).

Živić i sur. analizirali su sadržaj fitokemikalija, ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijskog potencijala ekstrakata plodova *Juniperus communis* L. i *Juniperus oxycedrus* L. Za postupak ekstrakcije korišteni su etanol, etil acetat i kloroform. Za vrstu *Juniperuscommunis* L. najveći udio ukupnih fenola dobili su u etanolnom ekstraktu (189,82 ± 0,27 mg GAE/g sušenog ekstrakta), slijede etil acetat s 144,21 ± 0,18 mg GAE/gsušenog ekstrakta i kloroform s 132,74 ± 0,13 mg GAE/g sušenog ekstrakta. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima ovog diplomskog rada, obzirom da jedobiven bolji fenolni prinos korištenjem etanola kao otapala (56).

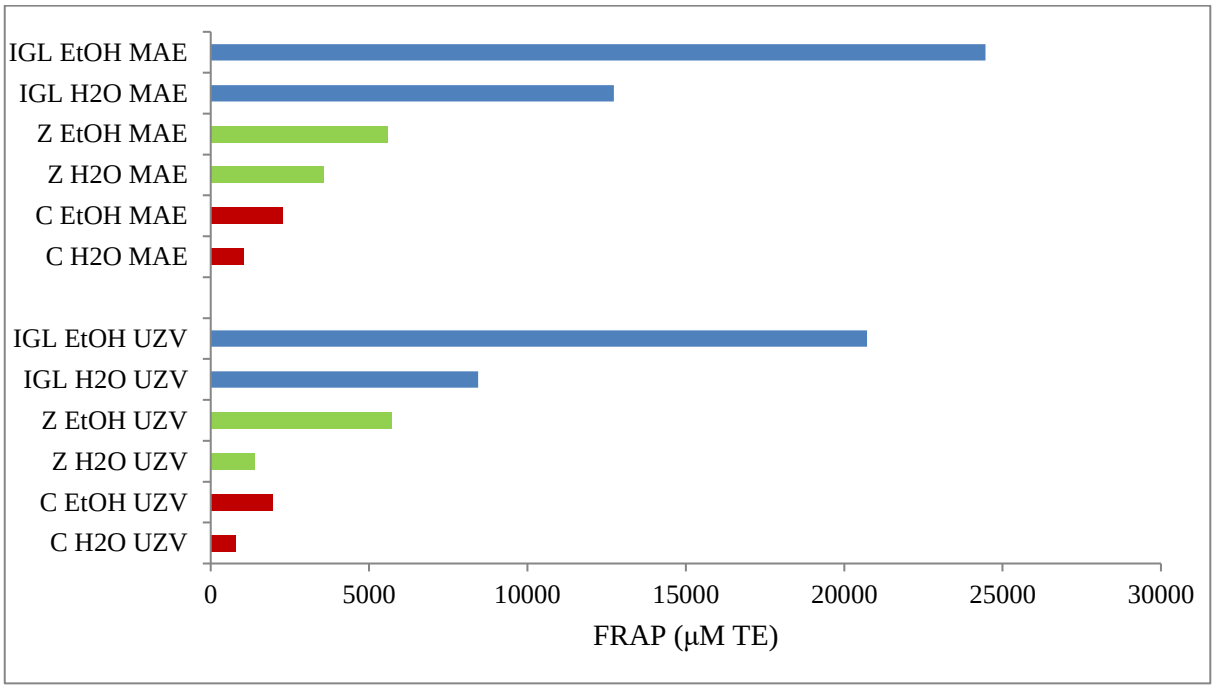
Fejér i sur. također su analizirali sadržaj ukupnih fenola u plodu borovice. Za ekstrakciju su koristili 70%-tni etanol. Uspoređivali su sadržaj fenola dobiven ekstrakcijom ploda kojem je perikarp zdrobljen u odnosu na plod s netaknutim perikarpom. Ovisno o lokalitetu i godini ubranih plodova, rezultati su pokazali veću učinkovitost ekstrakcije iz ploda koji je bio zdrobljen odnosno od 151,84 do 278,19 mg GAE/L, dok se sadržaj ukupnih fenola iz ploda s netaknutim perikarpom kretao od 43,75 do 246,75 mg GAE/L (57).

3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijski kapacitet povezan je s koncentracijom komponenata uzorka koje mogu zaštititi biološki sustav od štetnog utjecaja reaktivnih kisikovih ili dušikovih vrsta (ROS ili RNS). Danas su dostupne različite metode mjerenja antioksidacijskog kapaciteta koje koriste različite reaktivne vrste, što rezultira različite vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta za isti ispitivani uzorak. Stoga je jako bitno kombinirati različite metode kako bi se u konačnici odredila aktivnost prisutnih antioksidansa.

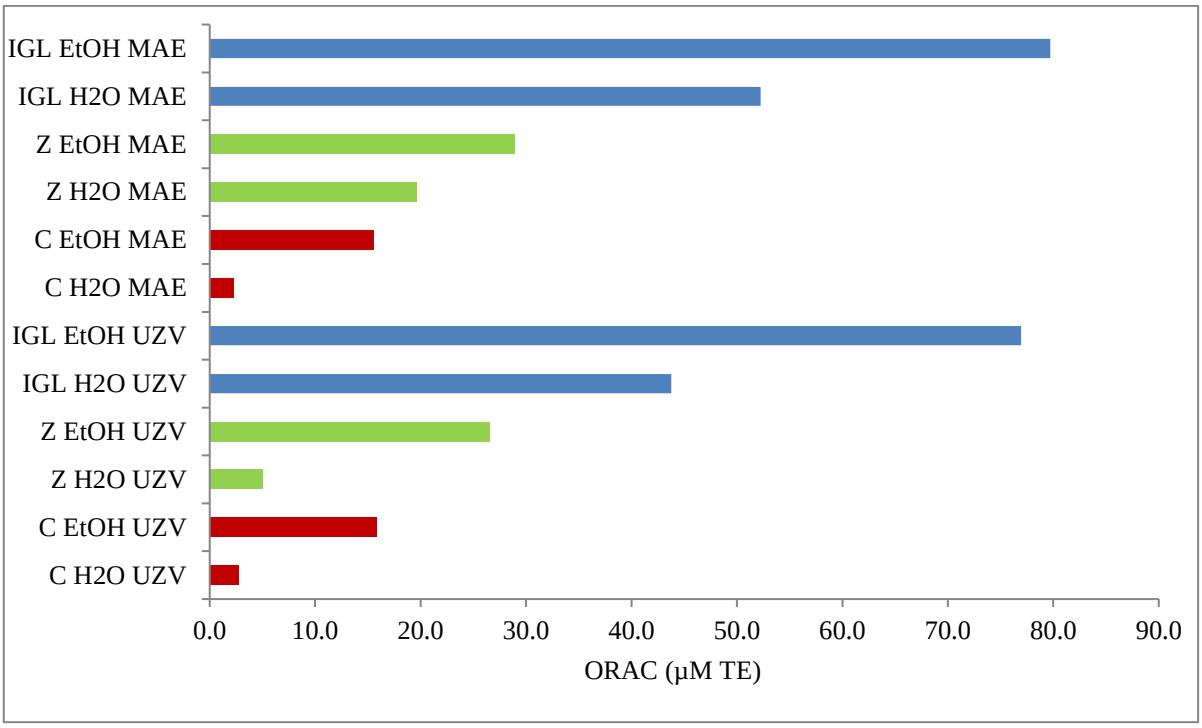
SET (engl. *Single Electron. Transfer*) i HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) predstavljaju dva osnovna mehanizma pomoću kojih antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale. Pomoću SET mehanizma mjeri se sposobnost kojom antioksidans doniranjem elektrona može reducirati radikale i slične komponente. Neke od metoda koje koristi SET mehanizam su: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant power*) i TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). S druge strane, u HAT mehanizmu donira se vodikov atom i na taj način mjeri sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima. Najpoznatije metode koje djeluju na principu HAT mehanizma su: TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidat Parametar*), metoda izbjeljivanja krocina (engl. *Crocin bleachng assay*), ORAC metoda (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) te DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl-hydrate*) metoda (58,59).

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti antioksidacijski kapacitet dvanaest različitih ekstrakataborovice korištenjem FRAP, ORAC i DPPH metode. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 24-26.



Slika 24. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata borovice FRAP metodom

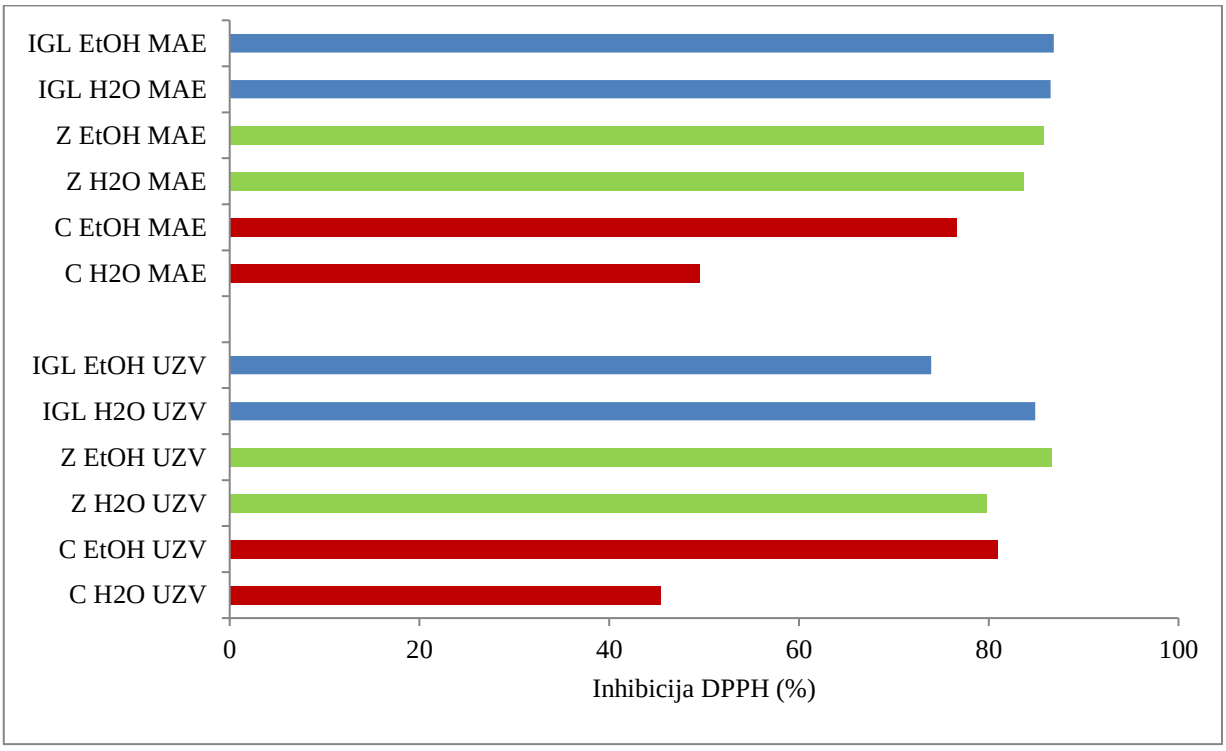
Iz rezultata određivanja redukcijske sposobnosti FRAP metodom vidljivo je da najbolju antioksidacijsku aktivnost ponovno pokazuju etanolni ekstrakti u usporedbi s vodenim ekstraktima što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola. Najbolju aktivnost pokazuje MAE etanolni ekstrakt iglica borovice (24461,5±154 µM TE), što se pripisuje i najvećem udjelu ukupnih fenola pronađenom u istom ekstraktu. Nadalje, UZV etanolni ekstrakt iglica borovice također pokazuje visoku redukcijsku sposobnost s FRAP vrijednosti od 20717,9±235 µM TE. Najslabiji antioksidacijski potencijal imali su UZV i MAE vodeni ekstrakti crvenih plodova borovice (FRAP vrijednost 805,64±25µM TE i 1037,43±25 µM TE, redom) što je bilo i očekivano obzirom da su bili najsiromašniji ukupnim fenolima.



Slika 25. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata borovice ORAC metodom

Primjenom ORAC metode najbolju antioksidacijsku aktivnost ponovno su potvrdili etanolni ekstrakti, a najbolji je bio ekstrakt iglica borovice EtOH (MAE s vrijednosti od 79,7±2,5 µM TE i UZV s vrijednosti od 77±1,9 µM TE), što se također može povezati s visokim udjelom ukupnih fenola u tim ekstraktima.

Ekstrakti zelenih plodova borovice pokazuju veće ORAC vrijednosti (od 5 do 28,9 µM TE) u odnosu na ekstrakte crvene borovice (od 2,3 do 15,8 µM TE) osobito oni pripravljeni MAE metodom ekstrakcije. Sa slike 25. vidljivo je i da su svi vodeni ekstrakti imali dva do pet puta slabiji učinak u odnosu na etanolne ekstrakte. Antioksidacijska aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata bila je gotovo identična kod UZV i MAE što je izuzetno zanimljivo jer kod npr. zelenih plodova MAE ekstrakcija osim što je dala veći udio ukupnih fenola, pokazuje i bolji antioksidacijski učinak istih ekstrakata.



Slika 26. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata borovice DPPH metodom

Zanimljivo je da su korištenjem metode DPPH svi testirani ekstrakti pokazali iznimno dobar antioksidacijski kapacitet. Samo MAE i UZV vodeni ekstrakti crvenih plodova borovice nisu dosegli više od 50% inhibicije DPPH radikala. Svi ostakli ekstrakti su imali antioksidacijski kapacitet preko 70%. MAE etanolni ekstrakt iglica borovice ponovno pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost s vrijednosti od 86,85%.

Veliki % inhibicije DPPH radikala pokazuju i UZV i MAE etanolni ekstrakt zelenih plodova borovice (86,6% inhibicije i 85,7% inhibicije) te MAE vodeni ekstrakt iglica borovice s % inhibicije DPPH radikala u iznosu od 86,5. Kao što je prikazano na slici 26. ostali ekstrakti imaju slične vrijednosti % inhibicije DPPH radikala (73,9-84,8%).

Brojna istraživanja dokazuju dobar antioksidacijski potencijal borovice.

Orhan i sur. analizirali su pet vrsta borovice (*J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *J. communis* subsp. *nana*, *J. sabina*, *J. foetidissima*, *J. excelsa*) i odredili njihov antioksidacijski potencijal korištenjem metode DPPH i FRAP. Ekstrakti su pripravljeni od lista borovice, zrelog i nezrelog ploda borovice korištenjem vode i 50%-tnog etanola. Etanolni ekstrakt lista *J. communis* ssp. *nana* je pokazao najbolju aktivnost protiv DPPH radikala (91,40 ± 0,54%), nakon čega slijedi etanolni ekstrakt lista *J. foetidissima* (91,21 ± 0,45%). U FRAP testu, etanolni ekstrakti lista *J. foetidissima* i *J. communis* ssp. *nana* pokazali su najveću apsorbanciju na 700 nm, 1,977 ± 0,005 i 1,971 ± 0,057 (60).

Zheljazkov i sur. u svom radu utvrdili su antioksidacijski potencijal esencijalnog ulja 3 vrste borovice (*J. scopulorum*, *J. horizontalis*, *J. communis*) ORAC metodom. Ulja *J. scopulorum* i *J. horizontalis* imala su značajno veći antioksidacijski kapacitet (58,7 i 59,5 µM / g) od ulja *J. communis* (11,8 µM / g), a rezultati su izraženi kao µM Trolox g^{-1} (61).

4. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Svi ispitivani uzorci pokazuju izrazito dobru antioksidacijsku aktivnost i dobar sadržaj ukupnih fenola.

- Etanolni ekstrakti sadržavali su veći udio fenola i bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vodene ekstrakte.

- Uspoređujući UZV i MAE ekstrakciju, MAE se nametnula kao bolji izbor jer je sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal bolji, a vrijeme provedbe ekstrakcije kraće.

- Rezultati dobiveni FRAP, ORAC i DPPH metodama ukazuju da MAE etanolni ekstrakt iglica borovice ima najjaču antioksidacijsku aktivnost što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola.

5. LITERATURA

1. Grlić L. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb: ″August Cesarec″.1990.
2. Šilić Č. Endemične biljke. Sarajevo: Svjetlost. 1990.
3. URL:https://www.perforum.info/borovica-juniperus-communis/ (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
4. URL: https://www.plantea.com.hr/borovica/ (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
5. Seca AML, Silva AMS. The chemical composition of the *Juniperus genus* (1970-2004). Recent Progress in Medicinal Plants. 2005;(16):401-522.
6. Stanić A. Fitokemijska i antioksidacijska svojstva polifenola u vrstama *Juniperus oxycedrus* L. i *Juniperus phoenicea* L.,[Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2018.
7. URL: https://sh.wikipedia.org/wiki/Kvercetin (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
8. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Podophyllotoxin (PRISTUPLJENO 05.09.2020.)
9. Ludwiczuk A, Skalicka-Wozniak K, Georgiev MI. Pharmacognosy:Terpenoids, Chapter: 11. Academic press. 2017:233-266.
10. URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Izopren (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
11. URL: https://sh.wikipedia.org/wiki/Kariofilen (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
12. Ložienė K, Venskutonis PR. Essential oils in food preservation, flavor and safety:Juniper (*Juniperus communis* L.) oils. Department of nutrition and dietetics King's College London, London, UK. Preedy VR, 2016.
13. Raina R,Verma PK, Peshin R, Kour H. Potential of *Juniperus communis* L. as a nutraceutical in human and veterinary medicine. Heliyon. 2019;5.
14. Li XJ, Yang YJ, Li YS, Zhang WK, Tang HB. α-Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. Journal of Ethnopharmacology. 2016;(179):22–26.
15. URL:https://alternativa-webshop.com/products/etericno-ulje-borovica-goloka-10ml (PRISTUPLJENO 05.9.2020.)
16. URL: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-the-a-and-b-pinene-unsaturated-bicyclic-monoterpenes_fig1_312573761(PRISTUPLJENO 05.9.2020.)

17. Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalođera Z, Blažević N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*).Acta Pharmaceutica. 2005;(55):417–422.
18. Sati SC, Joshi S. Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya. African Journal of Microbiology Research.2010;12(4):1291–1294. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1
19. Gordiena AY, Graya AI, Franzblaub SG, Seidela V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (*Cuppressaceae*). Journal of Ethnopharmacology. 2009;(126):500–505.
20. Vladimir-Knežević S, Blaženković B, Bival Štefan M, Alegro A,Kőszegi T, Petrik J.Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from Croatia. Molecules. 2011;(16):1454–1470.doi:10.3390/molecules16021454
21. Emami SA, Javadi B, Hassanzadeh MK. Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus communis*. subsp. *hemisphaerica*. and *Juniperus oblonga.* Pharmaceutical Biology. 2007;(45:10):769–776.
22. Höferl M, Stoilova I, Schmidt E, Wanner J, Jirovetz L, Trifonova D,Krastev L, Krastanov A. Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. Antioxidants. 2014;(3):81–98. doi:10.3390/antiox3010081
23. Šojić B, Tomović V, Jokanović M, Ikonić P, Džinić N, Kocić-Tanackov S, Popović Lj, Tasić T, Savanović J, Živković Šojić N.Antioxidant activity of *Juniperus communis* L. Essential oil in cooked pork sausages.Czech Journal of Food Sciences. 2017;35(3):189–193. doi: 10.17221/210/2016-CJFS.
24. Orhan N. Bioactive food as dietary interventions for diabetes:Juniperus species: features, profile and applications to diabetes. Academic Press. Preedy V, Watson R, 2019.
25. Petlevski R, Hadžija M, Slijepeevce M, Juretic D. Effect of "antidiabetis" herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice.Journal of Ethnopharmacology. 2001;75(2-3):181–184.
26. Banerjee S, Singh H, Chatterjee TK. Evaluation of anti-diabetic and antihyperlipidemic potential of methanolic extract of *Juniperus Communis* L. in

streptozotocin nicotinamide induced diabetic rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2013;4(3):10–17.

27. Bais S, Gill NS, Rana N, Shandil S. A phytopharmacological review on a medicinal plant: *Juniperus communis*.International Scholarly Research Notices. 2014:634–723.
28. Cioanca O, Hancianu M, Mihasan M, Hritcu L. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of inhaled juniper oil on amyloid beta (1-42)-induced oxidative stress in the rat hippocampus.Neurochemical Research. 2015;40(5):952–960.
29. Manvi, Garg GP. Screening and evaluation of pharmacognostic, phytochemical and hepatoprotective activity of *J. communis* L. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010;3(1).
30. Singh H, Prakash A, Kalia AN, Majeed AB. Synergistic hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Solanum xanthocarpum* and *Juniperus communis* against paracetamol and azithromycin induced liver injury in rats. J. Tradit. Complement Med. 2015;6(4):370–376.
31. Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu SM, Cimpeanu C, Georgescu MI,Radu Fierascu RC,Ortan A, Sutan AN, Anuta V, Zanfirescu A, Dinu-Pirvu CE, Velescu BS. Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wildgrowing *Juniperus communis* L. (*Cupressaceae*) native to Romanian southern sub-Carpathian hills. BMC Complement Altern. Med. 2018;3(1).
32. Yaglioglu AS, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. South African Journal of Botany. 2017;(113):29–33.
33. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants: Review. Trends in Food Science & Technology. 2006;17:300–312.
34. Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva: pregledni rad. Croat. J. Food Sci. Technol. 2011;3(1):32–47.
35. Xu BJ, Chang SKC. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal of Food Science. 2007;72(2):159–166.

36. Devgun M, Nanda A, Ansari SH. Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 2012;69(3):475–485.
37. Gupta A, Kothari V, Naraniwal M. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. International Journal of Applied and Natural Sciences. 2012;(1:1):8–26.
38. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave Assisted Extraction–an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research:review article. Pharmacognosy Reviews. 2007;1(1).
39. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. Phytochem. Anal. 2002;(13):105–113. doi: 10.1002/pca.631.
40. Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva: pregledni rad. Croat. J. Food Sci. Technol. 2010;2(2):22–33.
41. Čirjak M. Primjena ultrazvuka za ekstrakciju steviol glikozida iz lista stevije[Završni rad]. Zagreb, Hrvatska:Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2015.
42. Mikulec M.Primjena hibridne statističke analize energije u prognozi razina buke na brodovima[Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Fakultet strojarstva i brodogradnje; 2018.
43. Astráin-Redín L, Ciudad-Hidalgo S, Raso J,Condón S, Cebrián G, Álvarez I.Application of high-power ultrasound in the food industry: sonochemical reactions. Selcan Karakuş, IntechOpen. 2019. doi: 10.5772/intechopen.90444.
44. Brnčić M, Tripalo B, Penava A,Karlović D, Ježek D, Karlović S, Bosiljkov T.Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane: Stručni rad. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam. 2009;4(1-2).
45. Šimić I. Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja[Diplomski rad].Zagreb, Hrvatska: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije ; 2015.
46. Chemat F, Zill-e-Huma, Khan MK. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry. 2011;(18):813–835.

47. Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer JP, Mason TJ. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry. 2004;(11):261–265.
48. Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. Article in Innovative Food Science &Emerging Technologies. 2008. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014
49. Singleton VL, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult. 1965;16:144-158.
50. Prior R., Xianli W., Schaich K., Standardized methods for the determinationof antioxidant capacity and phenolics in foodand dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 2005;53(1):4290–4302.
51. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Agric Food Chem. 2002;50:4437–4444.
52. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α-Tocopherol, BHT, and BHA. J. Agric. Food. Chem. 1997;45(3):632–638.
53. Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. Analytical sciences. 2018;34.
54. Modnicki D, Łabędzka J. Estimation of the total phenolic compounds in juniper sprouts (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*) from different places at the kujawsko-pomorskie province. Herba Polonica. 2009;55(3):127–132.
55. Plećaš AM. Antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata odabranih vrsta rod*a Juniperus*,[Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska:Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2018.
56. Živić N, Milošević S, Dekić V,Dekić B, Ristić N, Ristić M, Sretić Lj.Phytochemical and antioxidant screening of some extracts of *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* L. Czech Journal of Food Sciences. 2019;37(5):351–358.

57. Fejér J, Kron I, Grul'ová D, Eliašová A. Seasonal variability of *Juniperus communis* L. berry ethanol extracts: 1. *In vitro* hydroxyl radical scavenging activity: Article.Molecules. 2020. doi:10.3390/molecules25184114.
58. Mandić V. Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani [Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2017.
59. Skroza D.Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveratrola u binarnim fenolnim smjesama[Doktorska disertacija]. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2015.
60. Orhan N, Orhan IE, Ergun F. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five Juniperus species. Food and Chemical Toxicology. 2011;49:2305–2312.
61. Zheljazkova VD, Astatkieb T, Jeliazkovaa EA,Heidelc B, Ciampac L.Essential oil content, composition and bioactivity of juniper species in Wyoming, United States. Natural Product Communications. 2017;12(2):201–204.