# Optimiranje procesa ekstrakcije i destilacije bioaktivnih spojeva iz lista tršlje (Pistacia lentiscus L.)

**Dragović, Sanja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:480685

*Rights / Prava:* Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Sanja Dragović

# OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE I DESTILACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Sanja Dragović

# OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND DISTILLATION PROCESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE MASTIC TREE LEAF (*Pistacia lentiscus* L.)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Sanja Dragović

# OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE I DESTILACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Zoran Zorić, viši znanstveni suradnik

Zagreb, 2020.




University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Sanja Dragović

# OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND DISTILLATION PROCESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE MASTIC TREE LEAF (*Pistacia lentiscus* L.)

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Ph.D. Zoran Zorić, Senior research associate

Zagreb, 2020.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište u Zagrebu** **Doktorski rad**
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**
**Sveučilišni poslijediplomski (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo**

**UDK: 547.56: 634.574: 66.048: 665.52/.54(043.3)**
**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

# OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE I DESTILACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)

**Sanja Dragović, mag. ing. bioproc.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva i Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu, Laboratoriju za plinsku kromatografiju Ireks Arome d.o.o. u Jastrebarskom i u Darkol d.o.o. u Stubičkoj Slatini.

**Mentor:** dr. sc. Zoran Zorić, viši znanstveni suradnik

## Kratki sažetak doktorskog rada

U ovom radu istraživan je utjecaj konvencionalne ekstrakcije (CE) te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) na sastav i udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, flavonoli i hidorksicimetne kiseline) lista tršlje sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka ubranog tijekom tri fenološke faze (cvatnja; rani plod i zreli plod) u ovisnosti o vrsti i polarnosti otapala (voda, 100% i 80% metanol i etanol) i vremenu ekstrakcije (30 - 210 minuta) kod CE, te temperature (50-70 °C), snage mikrovalova (200-500 W) i vremena (4-12 min) kod MAE. Optimalni uvjeti ekstrakcije definirani su na temelju masenih udjela fenolnih spojeva. Najbolji ekstrakcijski kapacitet kod CE i MAE postignut je upotrebom 80 %-tne vodene otopine metanola kao otapala i to kod CE tijekom 90 min, a kod MAE u vremenu od 12 min, temperaturi od 69 °C i snazi mikrovalova od 500 W. U ekstraktima lista tršlje dobivenim pri optimalnim uvjetima pomoću HPLC-DAD i LC-MS/MS provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinčanih fenolnih spojeva te se pokazalo da je najzastupljenija fenolna kiselina je 5-*O*-galoilkina kiselina, dok je miricetin ramnozid određen kao dominantni flavonol glikozid. Istraživan je i utjecaj tlaka na prinos eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka lista tršlje, te njihov antimikrobni učinak prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED pomoću disk difuzijske metode. GC-MS analizom identificirano i kvantificirano 56 sastavnica od kojih su α-pinen, β-pinen i limonen određene kao dominantne. Sva eterična ulja su pokazala umjereni antimikrobni učinak prema navedenim gram-negativnim bakterijama u usporedbi sa antimikrobnim učinkom antibiotika kloramfenikol. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja tršlje pripisuje se sinergističkom djelovanju svih sastavnica.

**Broj stranica:** 149
**Broj slika:** 27
**Broj tablica:** 28
**Broj literaturnih navoda:** 271
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** tršlja, konvencionalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenolni spojevi, parna destilacija, eterično ulje, antimikrobni učinak

**Datum obrane: 03. prosinca 2020.**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
3. Prof. dr. sc. Sanda Vladimir – Knežević
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb** **Ph. D. Thesis**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Postgraduate university (doctoral) study Biotechnology and Bioprocess Engineering**

**UDK: 547.56: 634.574: 66.048: 665.52/.54(043.3)**
**Scientific Area: Biotechnical sciences**
**Scientific Field: Biotechnology**

# OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND DISTILLATION PROCESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE MASTIC TREE LEAF (*Pistacia lentiscus* L.)

**Sanja Dragović, mag. ing. bioproc.**

Thesis performed at Laboratory for drying Technologies and monitoring of biologically active compounds and in Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Laboratory for Molecular Microbiology, Institute Ruđer Bošković in Zagreb, Department of Environmental Protection and Health Ecology Andrija Štampar teaching institute of oublich health in Zagreb, Labortory for gas chromatography in Ireks Aroma d.o.o. in Jastrebarsko and Darkol d.o.o. in Stubička Slatina.

**Supervisors:** Ph.D. Zoran Zorić, Senior research associate

## Short abstract

This study researched the influence of conventional (CE) and microwave assisted extraction (MAE) on the composition and mass fractions of phenolic compounds (total phenols, flavonoids, flavonols and hydroxycinnamic acids) in mastic tree leaves harvested at locations Barbariga, Lun, Hvar and Vela Luka during three phenological stages (flowering, early and late fruiting) depending on the solvent type and polarity (100% water, 100% and 80% methanol or ethanol), extraction time (30-210 minutes) concerning CE as well as temperature (50-70°C), microwave power (200-500W) and time (4-12 min) regarding MAE. Optimal extraction conditions for CE and MAE were obtained by using 80% methanol as a solvent during 90 minutes regarding CE and 12 minutes concerning MAE at temperature of 69 °C and microwave power of 500 W. In mastic tree leaves extracts obtained by optimal extraction conditions, phenolic profile was determined using HPLC-DAD and UPLC-MS/MS methods by which the dominant fenolic acid determined was 5-*O*-galloylquinic acid, while myricetin rhamnoside was deterimined as a dominant flavonol gylcoside. Furthermore, the influence of pressure on the mastic leaf essential oil yield was researched as well as their antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli* strain AB1157 and *Erwinia amylovora* strain EaED by disc-diffusion method. Using GC-MS analysis, 56 components of the obtained essential oil were identified and quanitified among which α-pinene, β-pinene and limonene were determined as dominant. All essential oil samples exhibited moderate antimicrobial activity against mentioned gram-negative bacteria, in comparison to antibiotic chloramphenicol, due to the synergictic activity of all essential oil compounds.

**Number of pages:** 149
**Number of figures:** 27
**Number of tables:** 28
**Number of references:** 271
**Original in:** Croatian

**Key words:** mastic tree, conventional extraction, microwave assisted extraction, phenolic compounds, steam distillation, essential oil, antimicrobial activity

**Date of the thesis defense: 3rd December 2020.**

**Reviewers:**
1. Ph. D. Jagoda Šušković, Full professor
2. Ph. D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. Ph. D. Sanda Vladimir – Knežević, Full professor
4. Ph. D. Blaženka Kos (substitute), Full professor

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.




Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva i Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu, Laboratoriju za plinsku kromatografiju Ireks Arome d.o.o. u Jastrebarskom i u Darkol d.o.o. u Stubičkoj Slatini u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020. pod mentorstvom dr. sc. Zorana Zorića, višeg znanstvenog suradnika.















Tema rada prihvaćena je na 7. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu god. 2018./2019. održanoj dana 24. travnja 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 10. prosinca 2019. godine na 4. redovitoj sjednici u 351. akademskoj godini (2019./2020.).

## *Informacije o mentoru*

Dr. sc. Zoran Zorić diplomirao je 1993. godine, smjer biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu (PBF), Sveučilišta u Zagrebu.

Na istom fakultetu bio je zaposlen kao mlađi asistent u Zavodu za kemiju i biokemiju, u Laboratoriju za organsku kemiju od 1994. – 1997. godine. Magistrirao je u svibnju 1997. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, a doktorski rad obranio je 2014. godine na PBF-u. Od 1997. – 2002. godine bio je zaposlen kao tehnolog u proizvodnji u Solani Pag, a kao profesor kemije u Zadarskoj privatnoj gimnaziju od 2002. – 2010. godine. Od studenoga 2010. zaposlenik je PBF-a najprije kao suradnik na projektu „Višnja maraska (*Prunus cerasus*, var. Marasca) kao sastojak funkcionalne hrane" (IPA 2007/HR/16IPO/001-040302), a nakon toga kao stručni suradnik te od 2018. godine kao stručni savjetnik u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva. U navedenom Laboratoriju sudjeluje u provođenju znanstvenih istraživanja, izradi završnih, diplomskih i doktorskih radova, edukaciji i provođenju istraživanja u okviru međunarodne razmjene studenata, te suradnji sa ostalim znanstveno-istraživačkim institucijama i fakultetima iz RH, Biotehničkim fakultetom Sveučilišta u Ljubljani i Poljoprivrednim fakultetom u Novom Sadu.

Do sada je bio suradnik na 7 nacionalnih projekata od kojih su trenutno aktivni "Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizama", HRZZ i "Primjena visokog hidrostatskog tlaka u proizvodnji funkcionalnih sokova na bazi voća i povrća", HRZZ, te 6 međunarodnih znanstvenih projekta, od kojih su trenutno aktivni „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi", EU i MZO i "BioProCro" - Znanstveni centar izvrsnosti za Bioprospecting mora. Kao rezultat sustavnog i dugogodišnjeg bavljenja znanstveno-istraživačkim radom objavio je 25 znanstvenih radova u časopisima visokog faktora odjeka (najvećim dijelom Q1 i Q2). Sudjelovao je na više znanstvenih skupova u zemlji i inozemstvu sa usmenim ili poster priopćenjima, a aktivno je bio uključen i u različite oblike suradnje sa drugim institucijama.

Pod njegovim mentorstvom uspješno su obranjena 3 završna i 2 diplomska rada.

U zvanje znanstvenog suradnika izabran je 2016., a višeg znanstvenog suradnika 2019.godine, a pri Odjelu za ekologiju, agronomiju i akvakulturu Sveučilišta u Zadru u zvanje naslovnog docenta 2017. godine

Kao član projektnog tima dobitnik je Certifikata za najuspješniji lokalni EU projekt u RH za razdoblje od 2010. do 2013. godine (IPA projekt - Višnja maraska (*Prunus cerasus* var. Marasca) kao sastojak funkcionalne hrane), Ministarstvo regionalnog razvoja i fondova EU te Zlatne plakete ARCA 2015.- za isti IPA projekt, 8. Međunarodni sajam inovacija u poljoprivredi, prehrambenoj industriji i

poljoprivrednoj mehanizaciji te Nominaciju i priznanje RegioStars 2016 za projekt „The application of innovative technologies in bioactive compounds isolation from organic waste in the wine production“- jedan od 5 najuspješnije provedenih projekata iz kategorije „Sustainable Growth“ „Operatinal Programme Regional Competitiveness 2007-2013. Call: „Sthrengthening capacities for research, development and innovation ", Brisel, 2016

**Zahvale**

*Od srca se zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Zoranu Zoriću, višem znanstvenom suradniku, na svim savjetima, iskrenosti i utrošenom vremenu prilikom izrade ovoga rada. čije široko znanje, stručnost i iskustvo su bili vitalni u stvaranju ovoga rada. Osobita mi je čast što sam bila njegova prva doktorandica.*

*Veliku zahvalnost upućujem cijenjenim članovima komisije. Prof. dr. sc. Verici Dragović- Uzelac se zahvaljujem na njezinoj zaraznoj ljubavi prema znanosti, motivaciji i konstruktivnim savjetima koji su uvelike oblikovali ovaj rad, doc. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić na pozitivnoj energiji, oštroumnosti i savjetima kojima je unaprijedila ovaj rad, te prof. dr. sc. Sandi Vladimir – Knežević i prof. dr. sc. Jagodi Šušković na pristupačnosti i ukazanom povjerenju.*

*Zahvaljujem se i dr. sc. Marinku Petrović, prof. dr.sc. Edyti Đermić, dr.sc. Damiru Đermić, višem znanstvenom suradniku i Darku Kralj na pruženoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog rada. Bez vašeg razumijevanja, susretljivosti, nesebične pomoći i potpore ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Veliko hvala Valentini Kruk, mag. ing., Ivanu Martiću, mag. ing., Ani Oguić, mag. ing. te svim članovima Laboratorija za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva i Laboratorija za tehnologiju voća i povrća PBF-a koji su svojim preliminarnim istraživanjima doprinijeli ovome radu.*

*Zahvaljujem se Tatjani Grossi i Margiti Fekete, mojem kriznom stožeru, koje su sa mnom prolazile sve uspone i padove prilikom pisanja ovog rada. Objema hvala što ste me podizale kad bih pala, bodrile, motivirale i pomagale kako bi ostvarila svoj cilj.*

*Na pomoći i podršci zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama u Ireks Aromi d.o.o. koji nisu pojedinačno spomenuti, a pomogli su mi makar i sitnicom na bilo koji način.*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem gđi. Mariti i gosp. Jerolimu Petković, vaša znatiželja, ljubav i vjera u blagodati tršlje su rezultirali ovim radom.*

*Osobito se zahvaljujem se svojim roditeljima, Siniši i Mirjani, koji su beskompromisno odvajali od sebe i ulagali u moje obrazovanje kako bi lakše kročila kroz život, te što su me oblikovali u osobu kakva jesam danas. Bez vas ovaj rad ne bi niti postojao.*

*I na kraju, hvala mojem Amelu. Dugi niz godina, u dobrom i lošem, ti si moja stijena. Hvala ti što mi neumorno pružaš bezuvjetnu ljubav, mir, potporu i sigurnost. Ti si moja najbolja odluka i budućnost.*

# SAŽETAK

Tršlja (*Pistacia lenticus* L.) je zbog visokih udjela bioaktivnih molekula (BAM) izvrstan potencijal za preradu u proizvode kao što su mastik guma, ekstrakti i eterična ulja. Na sastav i masene udjele BAM utječu faktori poput lokacije i fenološke faze biljke, a zadržavanje BAM u ekstraktima ili eteričnim uljima ovisi o primijenjenoj metodi i uvjetima ekstrakcije.

U prvom dijelu ovog rada istraživan je utjecaj konvencionalne ekstrakcije te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na sastav i udio fenolnih spojeva (ukupne fenolne kiseline, ukupni flavonoidi, ukupni flavonoli i ukupne hidroksicimtne kiseline) lista tršlje sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka ubranim tijekom tri fenološke faze (faza cvjetanje (svibanj); faza ranog ploda (kolovoz); faza zrelog ploda (listopad)) u ovisnosti o vrsti i polarnosti otapala (voda, 100 % metanol i etanol, 80 % vodena otopina metanola i etanola) i vremenu ekstrakcije (30 - 210 minuta) kod konvencionalne ekstrakcije, te temperature (50 - 70 °C), snage mikrovalova (200 - 500 W) i vremena (4 - 12 min) kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Optimalni uvjeti ekstrakcije definirani su na temelju masenih udjela fenolnih spojeva. Najbolji ekstrakcijski kapacitet kod CE i MAE postignut je upotrebom 80 %-tne vodene otopine metanola kao otapala i to kod CE tijekom 90 min, a kod MAE u vremenu od 12 min, temperaturi od 69 °C i snazi mikrovalova od 500 W. U ekstraktima lista tršlje dobivenim pri optimalnim uvjetima pomoću HPLC-DAD i LC-MS/MS provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinčanih fenolnih spojeva te se pokazalo da je najzastupljenija fenolna kiselina je 5-*O*-galoilkina kiselina, dok je miricetin ramnozid određen kao dominantni flavonol glikozid. Vrijeme od 10 minuta, temperatura 43 °C i snaga 98 W su optimalni parametri kojima se postiže najveći maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi 80 %-tni etanol.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala se izrazito efikasnom za izolaciju ukupnih fenola iz lista tršlje zbog visokog ekstrakcijskog prinosa i kraćeg vremena ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom. Vrijeme ekstrakcije signifikantno je utjecalo na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva dok druga dva procesna parametra ne pokazuju statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije.

U drugom dijelu rada, istraživan je utjecaj tlaka na izolaciju eteričnih ulja iz uzoraka lista tršlje,-sastav eteričnih ulja te antimikrobni učinak prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED pomoću disk difuzijske metode. Procesom parne destilacije najveći prinosi eteričnih ulja određeni su pri tlaku od 1 bara, a GC-MS analizom identificirano je i kvantificirano 56 sastavnica koje predstavljaju 99,19 – 100 % ukupnog sastava eteričnog ulja lista tršlje od kojih su α-pinen,

β-pinen i limonen određene kao dominantne. Rezultati statističke analize, pokazali su da pojedinačno lokacija i fenološka faza, ali i njihovo kombinirano djelovanje imaju značajan utjecaj na udjele sastavnica i eteričnih ulja lista tršlje.

Sva eterična ulja su pokazala umjereni antimikrobni učinak prema navedenim gram-negativnim bakterijama u usporedbi sa antimikrobnim učinkom antibiotika kloramfenikol, a koji je posljedica sinergističkog djelovanja svih sastavnica eteričnog ulja.

S obzirom na sastav i masene udjele fenolnih spojeva te sastavnice eteričnih ulja, list tršlje predstavlja značajan izvor bioaktivnih molekula, a definirani optimalni uvjeti predstavljaju bazu za proizvodnju ekstrakata i eteričnih ulja visoke biološke vrijednosti.

**Ključne riječi:** tršlja, konvencionalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenolni spojevi, parna destilacija, eterično ulje, antimikrobni učinak

## SUMMARY

Mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) due to the high fractions of bioactive molecules (BAM) has the potential for being processed into diverse products such as mastic gum, extracts and essential oils. Content and mass fractions of BAM are influenced by factors such as location and harvesting time while BAM retention in extracts or essential oils is dependant on the applied extraction method and its conditions.

In the first part of this research, the influence of conventional (CE) and microwave assisted extraction (MAE) was researched on the composition and mass fractions of phenolics (total phenols, flavonoids, flavonols and hydroxycinnamic acids) in mastic tree leaves harvested at locations Barbariga, Lun, Hvar and Vela Luka during three phenological stages (flowering, early and late fuiting) depending on the solvent type and polarity (100 % water, 100 % and 80 % methanol or ethanol), extraction time (30 - 210 minutes) concerning CE as well as temperature (50 - 70°C), microwave power (200 - 500W) and time (4 - 12 min) regarding MAE. Optimal extraction conditions were determined based on the phenolics mass fractions. Optimal extraction capacity using CE was achieved by using 80 % methanol aqueous solution during 90 min, and regarding MAE after 12 minutes at temperature of 69 °C and power of 500 W.

Optimal extraction conditions for CE and MAE were obtained by using 80 % methanol as a solvent during 90 minutes regarding CE and 12 minutes concerning MAE at temperature of 69 °C and microwave power of 500 W. In mastic tree leaves extracts obtained by optimal extraction conditions, phenolic profile was determined by using HPLC-DAD and UPLC-MS/MS methods by which the dominant fenolic acid determined was 5-*O*-galloylquinic acid, while myricetin rhamnoside was deterimined as a dominant flavonol gylcoside. Extraction time od 10 minutes, temperature of 43 °C and microwave power of 98 W were the optimal conditions for obtaining the highest mass fractions of total phenols, total flavonoids, total falvonols and total hydroxycinnamic acids when 80 % ethanol was used as a solvent.

MAE has proven to be a very efficient method for the isolation of total phenolic compounds from the mastic tree leaves due to the high extraction yield and shortened extraction time in comparison to CE. Extraction time has significantly influenced the isolation of phenolic compounds efficiency while other parameters did not show a statistically significant influence on the extraction yield.

When using 80 % methanol as a solvent, MAE optimal conditions for obtaining the highest BAM yield were at temperature of 76 °C, microwave power 602 W and extraction time 12 min. Extraction time of 10 minutes at temperature of 43 °C with microwave power of 602 W were the optimal parameters for obtaining the highest mass fractions of total phenols, flavonoids, flavonols and hydrocinnamic acids when 80 % ethanol was used as a solvent.

In the second part of this research, the influence of pressure on the mastic leaf essentail oil yiled was researched as well as their antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli* strain AB1157 and *Erwinia amylovora* strain EaED by disc-diffusion method. The highest yields obtained by steam distillation were at pressure of 1 bar, and using GC-MS analysis 56 components were identified which represent 99,19 – 100 % of total mastic leaf essential oil among which α-pinene, β-pinene and limonene were determined as dominant. Statistical analysis results indicated that individually location and phenological stage as well as their combined effect had a significant influence on the compound fractions and chemical groups from mastic leaf essential oil.

All essential oil samples exhibited moderate antimicrobial activity against tested gram-negative bacteria, in comparison to antibiotic chloramphenicol, due to the synergictic activity of all mastic tree leaf essential oil compounds.

**Key words:** mastic tree, conventional extraction, microwave assisted extraction, phenolic compounds, steam distillation, essential oil, antimicrobial activity

# Sadržaj

**1. UVOD** ..... 1
**2. OPĆI DIO** ..... 4
2.1. Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) ..... 5
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke ..... 5
2.1.2. Kemijski sastav tršlje ..... 7
2.2. Fenolni spojevi tršlje ..... 8
2.2.1. Fenolne kiseline ..... 9
2.2.2. Flavonoidi ..... 12
2.3. Eterična ulja ..... 14
2.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja ..... 16
2.3.2. Eterično ulje tršlje ..... 17
2.4. Biološka svojstva ekstrakata i eteričnih ulja tršlje ..... 18
2.4.1. Antioksidacijski učinci BAM-a tršlje ..... 18
2.4.2. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja tršlje ..... 19
2.5. Čimbenici koji utječu na akumulaciju bioaktivnih molekula ..... 21
2.5.1. Biotički čimbenici ..... 22
2.5.2. Abiotički čimbenici ..... 23
2.6. Ekstrakcija bioaktvnih molekula ..... 26
2.6.1. Ne-konvencionalne metode ekstrakcije ..... 33
**3. MATERIJALI I METODE** ..... 38
3.1. Materijali ..... 39
3.1.1. Uzorci ..... 39
3.1.2. Kemikalije i standardi ..... 39
3.1.3. Oprema ..... 42
3.2. Metode ..... 42
3.2.1. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje konvencionalnom ekstrakcijom ..... 42
3.2.2. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE) ..... 43
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola ..... 44
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida ..... 46
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola ..... 47
3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju ..... 48
3.2.7. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju ..... 50

3.2.8. Dobivanje eteričnog ulja iz listova postupkom parne destilacije ..... 53
3.2.9. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih sastavnica eteričnog ulja tršlje primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS) ..... 53
3.2.10. Metoda određivanja antimikrobnog učinka eteričnog ulja tršlje primjenom disk-difuzijske metode ..... 54
3.2.11. Statistička analiza ..... 56
**4. REZULTATI I RASPRAVA** ..... 58
4.1. Optimiranje uvjeta ekstrakcije bam-a iz listova tršlje primjenom konvencionalne tehnike ekstrakcije ..... 60
4.1.1. Utjecaj lokacije i fenološke faze na masene udjele BAM-a u ekstraktima lista tršlje 65
4.1.2. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima lista tršlje primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV Photo Diode Array (PDA) detekciju ..... 70
4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije BAM iz listova tršlje primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) ..... 79
4.2.1. Utjecaj procesnih parametara na prinos fenolnih spojeva primjenom ekstrcije potpomognute mikrovalovima ..... 86
4.3. Utjecaj abiotičkih faktora na prinos i sastav eteričnog ulja lista tršlje ..... 93
4.4. Sastavnice eteričnog ulja lista tršlje (*Pistacia lenticus* L.) ..... 104
4.5. Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja lista tršlje ..... 115
**5. ZAKLJUČCI** ..... 119
**6. LITERATURA** ..... 122

# *1. UVOD*

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je zimzeleni grm iz porodice Anacardiaceae, široko rasprostranjena u mediteranskim zemljama uključujući i Republiku Hrvatsku gdje raste uzduž Jadranske obale i na otocima. Svi dijelovi biljke (korijen, stapka, grančice, list, plod) su izvor bioaktivnih molekula zbog kojih tršlja ima izvrstan potencijal za primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proizvodi tršlje kao što su eterično ulje, ekstrakti i mastik guma, stoljećima se koriste u narodnoj medicini kao preparati za liječenje i ublažavanje gastrointestinalnih, kardiovaskularnih i respiratornih oboljenja.

Od bioaktivnih molekula najznačajnije mjesto zauzimaju fenolni spojevi koji imaju važnu ulogu u rastu i reprodukciji biljke, a smatraju se i jakim antioksidansima s pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje. Najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u listovima tršlje, a najzastupljeniji su fenolne kiseline i flavonoidi. Galna kiselina je najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina u listu tršlje koja zajedno sa svojim derivatima (mono, di i tri-galoilkina kiselina) čini više od 70 % ukupnih fenolnih spojeva u listu. Osim navedenih, u listu tršlje identificirane su i siriginska i elaginska kiselina. Hidroksicimetnim kiselinama se pripisuje najjače antioksidativno djelovanje, a u listu tršlje su identificirani klorogenska kiselina, *p*-kumarinska-4-*O*-glukozid i kafeoilkina kiselina. Iz skupine flavonoida u listu tršlje najzastupljeniji su kvercetin i njegovi derivati (kvercetin-3-*O*-ramnozid) i derivati miricetina (miricetin-3-*O*-rutinozid).

Unatoč tome što su prisutna u malom udjelu eterična ulja tršlje sadrže širok spektar sastavnica koje pripadaju različitim skupinama spojeva koji imaju značajnu biološku vrijednost. Eterična ulja su smjese kemijskih spojeva za koje je dokazano da posjeduju antibakterijska, antifungalna, antiviralna i repelentna svojstva što je posljedica kemovarijabilnosti terepenskog sastava i njihove koncentracije. Ovisno o kemotipu, eterično ulje tršlje karakterizirano je sastavnicama koje pripadaju grupi monoterpena (α-pinen, β-pinen, β-mircen, limonen, terpinen 4-ol) i seskviterpena (β-kariofilen, germakren D, γ-kadinen). Antimikrobni učinak eteričnog ulja lista tršlje je dokazan na gram-pozitivnim (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii, Staphylococcus aureus*) i gram-negativnim sojevima (*Escherichia coli*, *Porphyrmonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia, Klebsiella pneumoniae*).

Različitosti u kemijskom sastavu eteričnog ulja i ekstraktima tršlje se pripisuju dijelu biljke iz kojeg su bioaktivne molekule ekstrahirane, okolišnim čimbenicima (biotičkim i abiotičkim), vremenu berbe i fenološkoj fazi biljke.

Odabir metode ekstrakcije je prvi i najvažniji korak u izolaciji bioaktivnih molekula kako bi se postigao njihov maksimalni prinos, a budući ne postoji jedinstveni standardni postupak ekstakcije, za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije sukladno karakteristikama biljke (morfološka i botanička obilježja, kemijski sastav, stabilnost ciljanih bioaktivnih molekula, topljivost i sl.). Najčešće primjenjivani postupak ekstrakcije je konvencionalna ekstrakcija (maceracija, destilacija, Soxhlet) uz primjenu organskih otapala, koja je karakterizirana dugim vremenom ekstrakcije, velikom potrošnjom otapala i energije što predstavlja rizik od degradacije termolabilnih spojeva. Upravo zbog tih razloga ispituju se učinkovitiji i ekološki prihvatljiviji postupci ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE), ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) koji smanjuju vrijeme ekstrakcije i potrošnju otapala.

Stoga su ciljevi ovoga istraživanja:

- Odrediti utjecaj lokacije i termina berbe na akumulaciju bioaktivnih molekula u listu tršlje tijekom vegetacije
- Usporediti konvencionalnu tehniku ekstrakcije s ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE) i optimirati uvjete pri kojima se dobivaju najveći prinosi
- Provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstrakatima dobivenih pri optimalnim uvjetima
- Definirati sastav ekstrakata i eteričnog ulja
- Ispitati potencijalni antimikrobni učinak eteričnog ulja na selektiranim vrstama mikroorganizama

# *2. OPĆI DIO*

## 2.1. Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.)

### 2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

Tršlja (*Pistacia lenticus* L.) je stoljećima vrlo cijenjena biljka u narodnoj medicini zbog svojih ljekovitih i aromatskih svojstava. Prvi poznati zapisi o tršlji potječu iz Biblije gdje se tršlja spominje pod nazivom „bakha“ (u prijevodu „suze“), ime koje je dobila zahvaljujući oleorezinu koji se izlučuje zarezivanjem kore. U vrijeme antičke Grčke Hipokrat prvi spominje tršlju pod nazivom „mastika“ što je izvedenica riječi „mastichein“, a znači „škrgutati zubima“, dok se u Rimskom Carstvu koristila kao prva žvakaća guma, a tijekom Otomanskog Carstva tršlja je imala vrijednost zlata. Najpoznatija je *P. lentiscus* je s otoka Chios gdje se tradicionalno uzgaja u gradićima koji se nazivaju mastichochoria.

Prema fosilnim dokazima (Zohary, 1952), starost biljke se procjenjuje na 40 milijuna godina, a samog roda 55-65 milijuna jer se pelud Anacardiaceae prvotno pojavio u paleolitiku (Muller, 1984).

Tršlja je zimzeleni grm ili nisko stablo koje pripada porodici Anacardiaceae (*Tablica 1*) (Kafkas i sur., 2015). Rod je raznospolan, s muškim i ženskim cvjetovima na zasebnim granama (Sola-Campoy i sur., 2015). Sadrži naizmjenične listove kožnate strukture, 4-6 para, dužine 1,5-3 cm, na vrhu formirane u lastin rep (*Slika 1*). Cvjetovi se razvijaju tijekom travnja i svibnja, plod tijekom srpnja i kolovoza, dok je sazrijevanje ploda tijekom listopada. Na muškim biljkama cvjetovi su tamno crvene, a na ženskim žute boje. Plod u obliku bobica, sazrijeva 150 - 230 dana nakon opadanja cvijeta (Jordano, 1989).

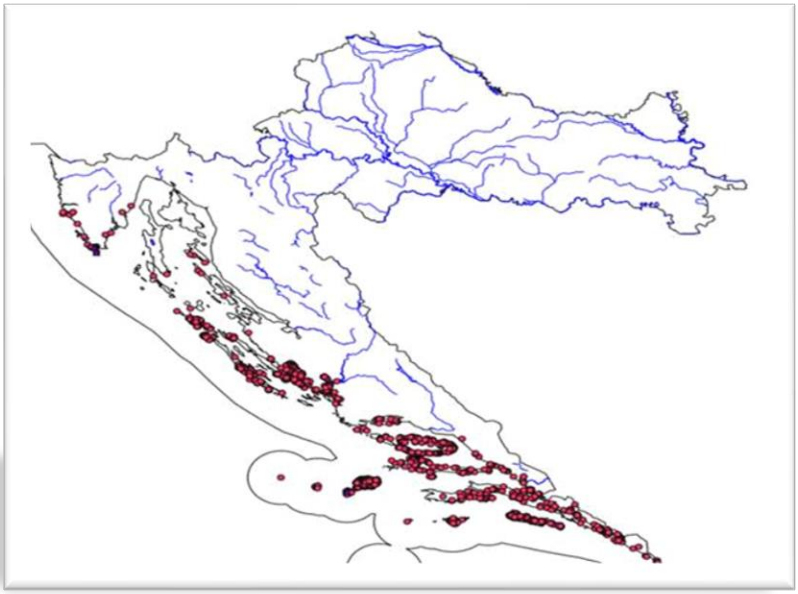
***Tablica 1***. Sistematika tršlje

| **Taksonomska kategorija** | **Naziv** |
|---|---|
| **Porodica** | Anacardiaceae |
| **Carstvo** | Plantae |
| **Red** | Sapindales |
| **Rod** | *Pistacia* L. |
| **Vrsta** | *Pistacia lentiscus* L. |



***Slika 1.*** Biljka *Pistacia lentiscus* L. (vlastita fotografija)

Tršlja je mediteranska biljka koja raste na širokom području od Izraela, preko Turske i Grčke do Španjolske (Tolić, 2003). U Hrvatskoj raste samoniklo duž Jadranske obale i na otocima, te najviše u Južnoj Dalmaciji (*Slika 2*). Na području Hrvatske, sinonimi za tršlju su narodni nazivi poput: smrča, lentiska, mrča, crnomrta, mastika i sl.



***Slika 2.*** Lokaliteti *P. lentiscus* duž Jadranske obale i otocima. Izvor: Nikolić (ur.) 2018: Flora Croatica Database. Biološki odsjek, PMF

### 2.1.2. Kemijski sastav tršlje

Kemovarijabilnost biljaka, pa tako i tršlje, je posljedica čimbenika kao što su okolišni uvjeti i zemljopisno područje rasta biljke. Fenološka faza rasta biljke, sezona berbe, izloženost biljke sunčevoj svjetlosti, padaline i reljef su neki od čimbenika o kojima ovise morfološke karakteristike biljke, te sastav i količina bioaktivnih molekula.

Istraživanja su pokazala da list *P. lentiscus* sadrži 90,2 % suhe tvari i 9,8 % vlage te je bogata fitonutrijentima kao što su fenolni spojevi, aromatski spojevi i minerali (Beghlal i sur., 2016). Prema istraživanju koje su proveli Aouinti i sur. (2013) u listu tršlje najzastupljeniji mineral je kalcij, a u plodu kalij. U listovima tršlje dokazali su prisutnost litija i selena u masenim udjelima od 1,59 odnosno 32,69 mg/kg.

Mezni i sur. (2014) su u hladno prešanom ulju dobivenom iz bobica tršlje identificirali i kvantificirali 2 tokoferola (α-tokoferol i γ-tokoferol) u masenim udjelima od 44,76 mg/kg do 96,77 mg/kg, te 3 karotenoida (lutein, zeaksantin, β-karoten) u masenim udjelima od 5,8 do 10,57 mg/kg. U prethodno provedenim istraživanjima listova i bobica tršlje, identificirani i kvantificirani su su mnogi spojevi različitih kemijskih grupa kao što su flavonoidi (Longo i sur., 2007; López-Lázaro i sur., 2009), fenolne kiseline (Bhouri i sur., 2010; Azaizeh i sur., 2013), terpenoidi (Dedoussis i sur., 2004) i tanini (Azaizeh i sur., 2013; Dedoussis i sur., 2004). Istraživanjem koje su proveli Zitouni i sur. (2016) na listovima i bobicama tršlje pokazali su da su listovi tršlje znantno bogatiji fenolnim spojevima od bobica što je bilo u skladu s istraživanjima koje su proveli Arab i sur., (2014), Longo i sur., (2007) i Remila i sur., (2015).

Osim fenolnih kiselina i flavonola u uzorcima svježih bobica tršlje identificirani su i kvantficirani antocijani i to: cijanidin 3-*O*-glukozid (3,8 mg/100 g), delfinidin 3-*O*-glukozid (1,1 mg/100 g), te cijanidin 3-*O*-arabinozid (0,05 mg/100 g) (Longo i sur., 2007).

Masne kiseline su uglavnom identificirane u plodovima tršlje od kojih je najzastupljenija oleinska kiselina, dok su palmitinska, linolenska, linolna, stearinska, palmitoleinska, arahidonska i gadoleinska kiselina kvantificirane nižim masenim udjelima (Trabesi i sur., 2012).

Nadzemni dijelovi biljke i bobice tršlje sadrže i eterična ulja čiji sastav se razlikuje ovisno o kemotipu, a najznačajnije sastavnice čine spojevi iz skupine monoterpena (α-pinen, β-pinen, β-mircen, limonen, terpinen 4-ol) i seskviterpena (β-kariofilen, germakren D, γ-kadinen) (Boelens i Jimenez, 1991; Buil i sur., 1975; Djenane i sur., 2011; Fernandez i sur., 2000).

## 2.2. Fenolni spojevi tršlje

U različitim biljnim vrstama zastupljen je velik broj (preko 200 000 spojeva) primarnih i sekundarnih metabolita koji se međusobno razlikuju prema molekulskoj strukturi, fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima. Primarni metaboliti su neophodni za održavanje stanice (proteini, nukleinske kiseline), dok su sekundarni metaboliti odgovorni za obranu biljke od oksidativnog stresa i ultraljubičastog zračenja (Chikezie i sur., 2015), a nastaju kao posljedica biotičkog i abiotičkog stresa (Rasoli, 2011). Primarni i sekundarni metaboliti su povezani međusobno građevnim blokovima i biosintetskim enzimima (Vora, 2017).

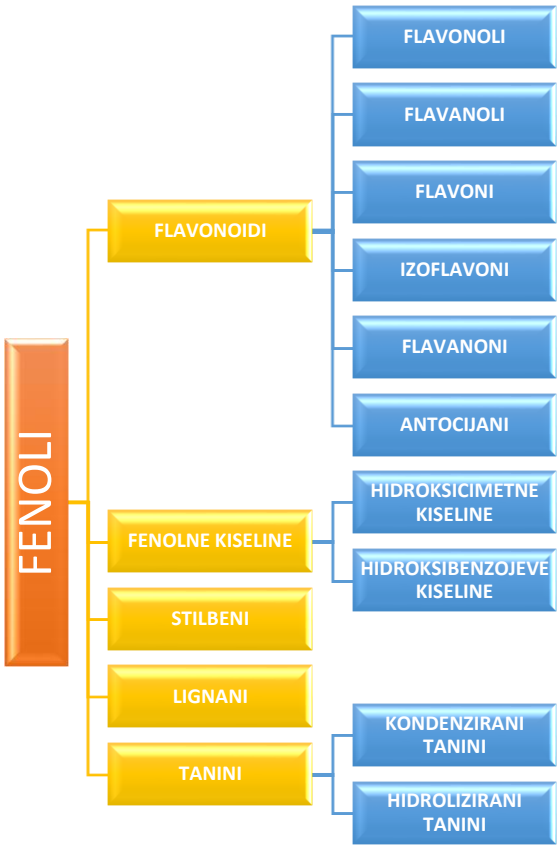
Mnoge BAM imaju ključnu ulogu u prirodnoj obrani biljke od infekcija i mikroorganizama, daju biljkama boju i okus, te omogućuju biljci lakšu prilagodbu promjenjivim okolišnim uvjetima (Schmidt i sur., 2008). Fenolni spojevi jedna su od važnijih skupina bioaktivnih molekula kojima se pripisuju brojni pozitivni utjecaji na zdravlje ljudi ili preventivno djelovanje u nastajanju različitih oboljenja. Pokazuju široki raspon bioloških učinaka u prevenciji raka, dijabetesa, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i drugih bolesti (Rasupuleti i sur., 2016; Rasoli, 2011).

***Fenolni spojevi*** su prirodni sekundarni metaboliti dobiveni putem acikličkih međuprodukata nastalih tijekom biosintetskog puta šikiminske kiseline (Macheix i sur., 1990). Zahvaljujući strukturnoj različitosti, poznato je preko 8000 fenolnih spojeva koji imaju esencijalnu ulogu u reprodukciji i rastu biljke, senzorskim svojstvima, boji, aromi, obrambenim mehanizmima protiv patogena, parazita i biljojeda, zaštiti od ultraljubičastog zračenja i dr. (Butler, 1992; Liu, 2004; Shahidi i Naczk, 2004). Najbrojniju grupu biljnih fenola čine flavonoidi koji čine dvije trećine ukupne količine fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani, dok ostatak čine fenolne kiseline i ostali spojevi (Liu, 2004).

Najjednostavnija podjela fenolnih spojeva temeljena na broju aromatskih jezgri u fenolnoj molekuli, jest podjela na ***monofenole*** (npr. fenolne kiseline i njihovi derivati, fenolni alkoholi itd.) i ***polifenole*** (npr. flavonoidi, stilbeni) (*Slika 3*) (Shahidi i Naczk, 2004). Monofenoli sadrže jedan prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, dok polifenoli sadrže veći broj aromatskih prstenova unutar jedne molekule, Također, postoji i druga podjela koja je temeljena prema njihovoj kemijskoj strukturi, a fenolne spojeve dijeli na ***neflavonoide*** i ***flavonoide*** (Shahidi i Naczk, 2004; Katalinić i sur., 2010).

Značajnu skupinu sekundarnih metabolita tršlje čine fenolni spojevi kao neisparljive, polarnije komponente, te različite sastavnice eteričnog ulja kao isparljive uglavnom nepolarne komponente. Udio fenolnih spojeva u tršlji razlikuje se ovisno o dijelu biljke (list, korijen, stabljika, cvijet, plod) (Bampouli i sur., 2014; Zitouni i sur., 2016), a uvelike ovisi o okolišnim uvjetima u kojima biljka raste.

Istraživanja su pokazala da su najveći maseni udjeli ukupnih fenola (izražena u miligramima galne kiseline po gramu ekstrakta- mg GAE/g), prisutni u listu tršlje (216,289 ± 20,62 mg GAE/g), potom u stabljici (121,399 ± 3,354 mg GAE/g) i bobici (103,342 ± 2,317 mg GAE/g) (Zitouni i sur., 2016).



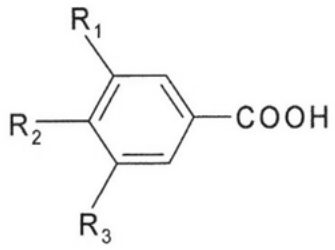

***Slika 3.*** Osnovna podjela fenolnih spojeva (Erdman i sur., 2007)

### 2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su vrlo rasprostranjene u prirodi, mogu se naći u brojnim biljkama te različitim dijelovima neke biljke. Pripadaju skupini jednostavnih fenola s benzenskim prstenom

koji ima najmanje jednu karboksilnu skupinu. Prema položaju karboksilne skupine u odnosu na aromatsku jezgru i stupnju hidroksilacije i metoksilacije mogu se podijeliti u dvije skupine: derivate ***hidroksibenzojeve kiseline*** (hidroksibenzoati) i derivate ***hidroksicimetne kiseline*** (hidroksicinamati) (Shahidi i Naczk, 2004).

***Hidroksibenzojeve kiseline*** imaju strukturu $C_1$-$C_6$ s varijacijama u osnovnoj strukturi kao što su hidroksilacija i metoksilacija aromatskog prstena (*Slika 4*). U ovu skupinu pripadaju: 4-hidroksibenzojeva, protokatehinska, salicilna, vanilinska, galna, siringinska i gentizinska kiselina (Pereira i sur., 2009). U biljkama se nalaze u slobodnom obliku ili u konjugiranim oblicima (Tomas-Barberan i Clifford, 2000). Primjer konjugirane hidroksibenzojeve kiseline je galna kiselina koja može biti dimer, trimer, tetramer (Clifford i Scalbert, 2000). Glavni izvor hidroksibenzojevih kiselina su voće, povrće, čajevi i žitarice.



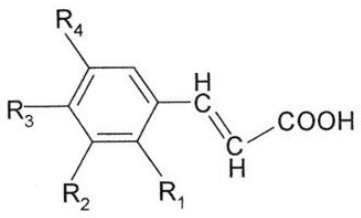

| **Hidroksibenzojeve kiseline** | **$R_1$** | **$R_2$** | **$R_3$** |
|---|---|---|---|
| *p*-hidroksibenzojeva (4-hidroksibenzojeva) | H | OH | H |
| protokatehinska (3,4-dihidroksibenzojeva) | OH | OH | H |
| vanilinska (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva) | $OCH_3$ | OH | H |
| gentizinska (2,4-dihidroksibenzojeva) | OH | H | OH |
| siringiska (3,5-dimetoksibenzojeva) | $OCH_3$ | H | $OCH_3$ |
| galna (3,4,5-trihidroksibenzojeva) | OH | OH | OH |

***Slika 4.*** Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Macheix i sur., 1990; Robards i sur., 1999)

Galna kiselina najzastupljenija je hidroksibenzojeva kiselina u listu tršlje (Trabelsi i sur., 2016; Bhouri i sur., 2010; Mehenni i sur., 2016) te zajedno sa svojim derivatima čini više od 70 % ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u listovima tršlje (Romani i sur., 2002). U istraživanju koje su proveli Azaizeh i sur. (2013) uspoređivan je fenolni sastav biljke porijeklom iz Italije i Izraela te

su uočeni vrlo slični rezultati u masenim udjelima derivata galne kiseline. Maseni udio derivata galne kiseline u listu tršlje prema istraživanju koje su proveli Mehenni i sur. (2016) iznosi 161,67 ± 35,27 mg GAE/g uzorka, a značajan je i njihov udio u ekstraktima bobica ove biljke (5,67 ± 0,017 mg GAE/g uzorka). Identificirani derivati galne kiseline u listovima tršlje su mono, di i tri-*O*-galoilkina kiselina i monogaloil glukoza, dok su u bobici identificirane 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza (Bozorgi i sur., 2013), 5-galoilkina kiselina te 3,4,5-*O*-trigaloilkina kiselina (Bhouri i sur, 2010; Mehenni i sur., 2016; Trabelsi i sur., 2014). U listovima su također identificirane siringinska i elaginska kiselina te njihovi derivati, koji nisu prisutni u bobicama tršlje. Maseni udio siringinske kiseline u suhom ekstraktu lista biljke iznosi 52,66 ± 7,23 mg/g dok maseni udio elaginske kiseline iznosi 9,54 ± 0,63 mg/g (Mehenni i sur., 2016). Osim navedenih, u listovima su identificirane i 3,5-*O*-galoilkina kiselina, 3,4,5-trigaloilkina kiselina i 5-*O*-galoilkina kiselina u masenim udjelima od 26,8 ± 4,67 mg/g, 10,3 ± 2,45 mg/g, odnosno 9,6 ± 2,25 mg/g suhe tvari (Romani i sur., 2002).

***Hidroksicimetne kiseline*** su derivati fenilpropanoida i imaju osnovnu strukturu $C_3$-$C_6$ s dvostrukom vezom i postraničnom lancu koji može imati *cis* ili *trans* konformaciju (*Slika 5*) (Pereira i sur., 2009). Hidroksicimetne kiseline nastaju direktno preko šikiminske kiseline ili mogu nastati degradacijom hidroksicimetnih kiselina. Rijetko se javljaju u slobodnom obliku, a češće u obliku estera četiriju osnovnih molekula povezanih sa strukturnim komponentama staničnog zida: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (Dai i Mumper, 2010; Ignat i sur., 2011).




| **Hidroksicimetne kiseline** | **$R_1$** | **$R_2$** | **$R_3$** | **$R_4$** |
|---|---|---|---|---|
| *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna) | H | OH | H | H |
| kafeinska (3,4-dihidroksicimetna) | OH | OH | H | $OCH_3$ |
| ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna) | $OCH_3$ | OH | H | $OCH_3$ |
| sinapinska (4-hidroksi-3,5-dimetoksicimetna) | $OCH_3$ | H | $OCH_3$ | OH |

***Slika 5.*** Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Goncalves i sur., 2013)

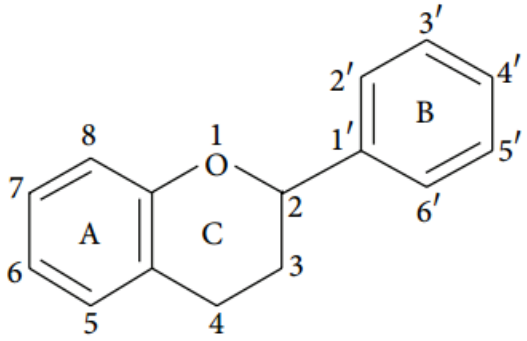
Najvažnije hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati prisutni u bobicama tršlje su: klorogenska kiselina, *p*-kumarinska-4-*O*-glukozid i kafeoilkina kiselina (Baratto i sur., 2003; Trabelsi i sur.,

2016; Bhouri i sur., 2010; Mehenni i sur., 2016). Prema istraživanju Lopes i sur. (2016), hidroksicimetne kiseline su također kvantificirane i u listovima tršlje u masenom udjelu od 21,8 ± 0,82 mg/g.

### 2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću skupinu niskomolekularnih polifenolnih spojeva (više od 6000) koji se akumuliraju u staničnim stijenkama biljaka (Monties, 1989), pretežito u epidermalnim i subepidermalnim slojevima ploda (Wollenweber, 1994). Ime su dobili prema latinskoj riječi "*flavus*" (žuta) iako su poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (antocijani) u biljnom tkivu (Winkel-Shirley, 2001), što je posljedica njihovog apsorpcijskog spektara u području valnih duljina od 250 do 270 nm, od 330 do 350 nm, a neki i u rasponu od 520 nm do 550 nm.

Flavonoidi su polifenolni spojevi koje nalazimo u biljkama, a sastoje se od petnaest ugljikovih atoma tipa $C_6$-$C_3$-$C_6$ odnosno dviju benzenskih jezgara povezanih propanskim lancem (*Slika 6*). Osnovna kemijska struktura flavonoida se sastoji od tri fenolna prstena: **A**, **B** i **C** (Tapas i sur., 2008). Benzenski prsten **A** je kondenziran s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten **C**, dok na poziciji 2 prstena **C** se nalazi benzenski prsten **B**. Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog **C**-prstena flavonodi se dijele u više podskupina.




***Slika 6.*** Osnovna struktura flavonoida (Del Rio i sur., 2013)

Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Ostale manje zastupljene skupine flavonoida su: čalkoni, dihidročalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auroni (Rodriguez-Mateos i sur., 2012). Međusobno

se razlikuju prema položaju prstena **B**, broju i položaju hidroksilnih i metoksi skupina, prisutnosti karbonilne skupine na $C_4$ atomu, oksidacijskom statusu prstena **C**, te vrsti, broju i položaju šećernih ostataka vezanih na aglikonsku strukturu. Glikozidacija kod flavonoida se događa najčešće u položaju 3-, a manje u položaju 7. Na aglikonski dio najčešće su vezani šećeri D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakturonska kiselina i disaharid rutinoza (glukoza + ramnoza).

Maseni udio ukupnih flavonoida (izražena u miligramima kvercetina po gramu suhog ekstrakta- mg QE/g) u ekstraktu lista tršlje dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iznosi 68,34 ± 0,10 mg QE/g suhog ekstrakta (Bampouli i sur., 2014). U tršlji su identificirani flavonoli, flavanoli, flavoni i antocijani.

Iz skupine ***flavona***, u listu tršlje identificirani su taksifolin (Teselkin i sur., 2000) i luteolin-6,8-di-C-heksozid (Trabelsi i sur., 2016).

Od ***flavonola*** u tršlji su identificirani kvercetin i njegovi derivati (Belhachat i sur., 2017). Mehenni i sur. (2016) su u listu tršlje identificirali i kvantificirali kvercetin-3-*O*-ramnozid s masenim udjelom od 0,12 ± 0,053 mg/g suhog ekstrakta lista, miricetin-3-*O*-rutinozid (Azaizeh i sur., 2013; Benhammou i sur., 2008) te kamferol u masenom udjelu od 0,68 ± 0,028 mg/g ekstrakta (Vaya i Mahmood, 2006). Derivati miricetina čine 20 % od ukupnih fenolnih spojeva u listu tršlje (Romani i sur., 2002). Baral i sur. (2017) i Trabelsi i sur. (2016) su istraživanjem dokazali da u bobicama prevladava kvercetin-3-*O*-glukuronid.

Jedini ***flavanol*** identificiran u listu tršlje je katehin čiji se maseni udjeli razlikuju ovisno o geografskom porijeklu same biljke. U uzorcima lista tršlje s područja Italije, katehini čine 2,5 %, dok u uzorcima izraelskog podrijetla oko 8% ukupnih fenolnih spojeva (Azaizeh i sur., 2013).

Iz skupine ***izoflavona***, Vaya i Mahmood, (2006) su u listu identificirali genistein i taksifolin u masenim udjelima od 0,225 ± 0,009 mg/g, odnosno 0,0509 ± 0,0021 mg/g.

Iz skupine antocijana u bobicama i listovima tršlje identificirani su cijanidin-3-*O*-glukozid i delfinidin-3-*O*-glukozid (Belhachat i sur., 2017), koji su uz pelargonidin-3-glukozid najrašireniji antocijani u prirodi (Kong i sur., 2003). U istraživanju koje su proveli Longo i sur. (2007), u bobicama tršlje kvantificirani su cijanidin-3-*O*-glukozid u masenom udjelu od 3,8 mg/100 g, delfinidin-3-*O*-glukozid 1,1 mg/100 g te cijanidin-3-*O*-arabinozid 0,05 mg/100 g.

## 2.3. Eterična ulja

Eterična ulja su prirodne, kompleksne mješavine bioaktivnih molekula (Poštić, 2009) tj. produkti koji se mogu definirati kao lako hlapljive smjese različitih spojeva karakterističnog mirisa i okusa, dobiveni iz biljnog materijala. Uskladišteni su u sekretornim stanicama, šupljinama, kanalima, epidermalnim stanicama i žljezdanim trihomama biljaka, odakle se ekstrahiraju. Biljkama pomažu u privlačenju kukaca koji sudjeluju u oprašivanju te kao zaštita od mikroorganizama, bolesti i biljojeda (Bakkali i sur., 2008; Vučinić i sur., 2012; Macwan i sur., 2016).

Sastav i kvaliteta eteričnih ulja mogu varirati ovisno o podneblju, vrsti tla, genetskim svojstvima biljke, sezoni berbe, zemljopisnom porijeklu, načinu dobivanja i dijelu biljke koji se koristi za njegovo dobivanje.

Zbog velikog broja kemijskih spojeva sadržanih u eteričnim uljima postoji širok opseg njihove primjene i djelovanja. Dokazano je da posjeduju antibakterijska, antifungalna, antiviralna i repelentna svojstva (Bougherra i sur., 2015), a pozitivan učinak pokazuju kao diuretici i spazomolitici. Stoga im je danas najveća primjena u području prehrambene (prirodni konzervansi), kozmetičke (proizvodnja parfema) i farmaceutske (aromaterapija) industrije (Sliva i sur., 2003).

Kemijski gledano, eterična ulja su smjese velikog broja različitih bioaktivnih molekula i do danas je utvrđeno oko 500 kemijskih spojeva koji čine njihov sastav, a pojedina ulja mogu sadržavati više od 60 različitih kemijskih sastavnica. Karakteriziraju ih dvije ili tri glavne komponente s visokim masenim udjelima (20 - 70 %) u odnosu na druge komponente prisutne u tragovima koje određuju fizikalna i kemijska svojstva, te farmakološko djelovanje eteričnog ulja (Pichersky i sur. 2006).

Općenito, glavni sastojci određuju biološka svojstva eteričnih ulja i uključuju dvije glavne skupine različitog biosintetskog porijekla: terpeni i terpenoidi te aromatski i alifatski spojevi (Bakkali i sur., 2008) koji pripadaju različitim skupinama organskih spojeva (ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, oksidi, itd.) (Noller, 1973).

***Terpeni*** su glavne komponente eteričnih ulja koje biljnom materijalu daju aromatski miris, a čija je biosintetska osnova izoprenska jedinica, molekulske formule $C_5H_8$.

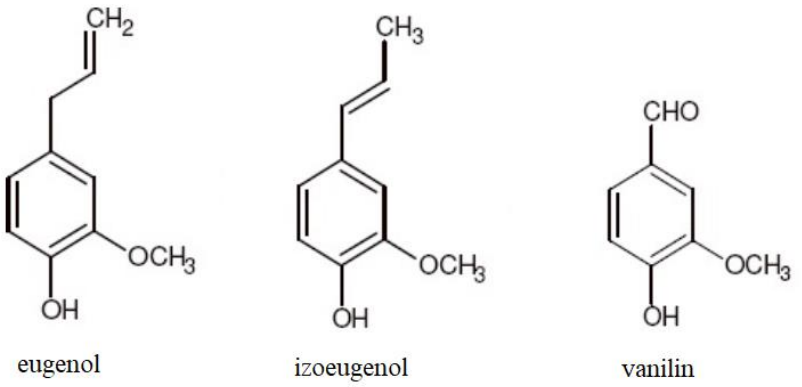
Prema broju C atoma te prema broju izoprenskih jedinica u molekuli dijele se na: hemiterpene, monoterpene, seskviterpene, diterpene, sesterpene, triterpene, tetraterpene, pentaterpene i politerpene (*Tablica 2*).

***Tablica 2.*** Klasifikacija terpena

| NAZIV | BROJ C-ATOMA | BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA | PREDSTAVNICI |
|---|---|---|---|
| **HEMITERPENI** | 5 | 1 | izopren |
| **MONOTERPENI** | 10 | 2 | geraniol, mentol, kamfor |
| **SESKVITERPENI** | 15 | 3 | farnezol, bisabolen |
| **DITERPENI** | 20 | 4 | fitol, vitamin A |
| **TRITERPENI** | 30 | 6 | skvalen, lanosterol |
| **TETRATERPENI** | 40 | 8 | karotenoidi |
| **POLITERPENI** | >40 | n | kaučuk |

Terpeni koji sadrže kisik nazivaju se ***terpenoidi***, a najpoznatiji su timol, karvakrol, linalol, geraniol i dr. Za razliku od terpena, terpenoidi često posjeduju jaka antibakterijska svojstva zahvaljujući funkcionalnim skupinama i to hidroksilnoj ili fenolnoj skupini (Bakkali i sur., 2008; Hyldgaard i sur., 2012).

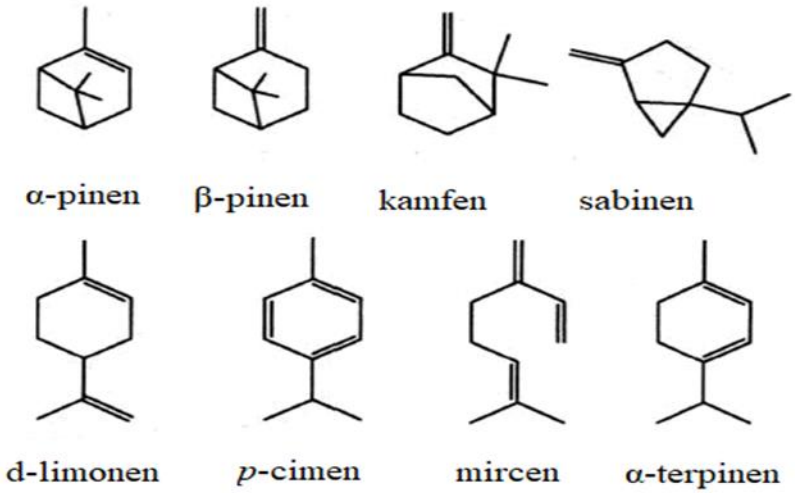
***Fenilpropanski derivati*** su prirodni, aromatski spojevi s propilnim lancem vezanim na benzensku jezgru. To su fenolni spojevi koji se prema kemijskoj strukturi dijele na fenolne kiseline (hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiselina i njihovi derivati), te flavonoide i njihove derivate. Međusobne razlike među fenolnim kiselinama unutar svake od podskupina uvjetovane su brojem i položajem hidroksilnih i metoksi supstituenata na aromatskom prstenu. Eugenol, izoeugenol, vanilin su najproučavaniji su fenilpropani (*Slika 7*). Antimikrobno djelovanje ovih spojeva temelji se na njihovoj slobodnoj hidroksilnoj skupini (Nazzaro i sur., 2013).




***Slika 7.*** Struktura fenilpropanskih derivata (Converti i sur., 2010)

### 2.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

U sastavu eteričnih ulja najznajčajniju ulogu imaju monotrepeni koji tvore više od 1500 raznih spojeva, te seskviterpeni s oko 1000 spojeva. Monoterpeni su glavne mirisne komponente eteričnih ulja i glavne komponente različitih smola koje sudjeluju u obrambenom odgovoru biljaka. Osnovnu strukturu monoterpena čine dvije izoprenske jedinice ($C_{10}$). Najvrjednije su molekule jer čine 90 % eteričnih ulja (Bakkali i sur., 2008), a najpoznatiji su *p*-cimen, d-limonen, α-terpinen, mircen, kamfen, sabinen i α- i β-pinen (*Slika 8*).




***Slika 8.*** Kemijske strukture monoterpena (Wojtunik-Kulesza i sur, 2019)

Seskviterpeni su po zastupljenosti druga grupa terpena koja ulazi u sastav eteričnih ulja. Izgrađeni su od tri izoprenske jedinice ($C_{15}$) i po strukturi mogu biti aciklički, monociklički i policiklički. Aciklični seskviterpeni se još nazivaju i farnezani jer nastaju od farnezola koji se nalazi u eteričnom ulju naranče i mandarine.

### 2.3.2. Eterično ulje tršlje

Koristeći konvencionalnu vodenu destilaciju, napravljena su brojna istraživanja identifikacije i kvantifikacije dominantnih sastavnica eteričnog ulja tršlje dobivenih iz nadzemnih dijelova biljke (Beghlal i sur., 2016; Yosr i sur., 2018). Različitosti u kemijskom sastavu eteričnog ulja tršlje pripisuju se dijelu biljke iz kojeg je ulje ekstrahirano, okolišnim čimbenicima, vremenu berbe (Ait Said i sur., 2011) i fenološkoj fazi biljke (Carvalho i sur., 2014).

Organoleptička i analitička svojstva eteričnog ulja tršlje dobivenog iz lista procesom destilacije u svom su radu opisali Berghlal i sur. (2016) kao bistru tekućinu, tamno žućkaste boje s jakim aromatičnim mirisom i začinskog okusa. Također, odredili su i kiselinski indeks koji iznosi 2,25 što upućuje na njegovu veliku stabilnost. Određeni analitički parametri su gustoća pri 20 °C (0,850-0,890 g/cm$^3$), te indeks refrakcije (1,400 - 1,450). Ovisno o kemotipu, eterično ulje tršlje je najvećim dijelom sastavljeno od monoterpena (α-pinen, β-pinen, β-mircen, limonen, terpinen 4-ol) i seskviterpena (β-kariofilen, germakren D, γ-kadinen) (Boelens i Jimenez, 1991; Buil i sur., 1975; Djenane i sur., 2011; Fernandez i sur., 2000).

Istraživanja eteričnih ulja iz različitih zemalja su pokazala postojanje neko različitih vrsta kemotipova koje karakteriziraju dominantne sastavnice kao što su mircen (19 %, Španjolska) (Boelens i Jimenez, 1991), α-pinen (15 %, Francuska) (Buil i sur., 1975), terpinen-4-ol (22 %, Sardinija; 33 - 44 %, Maroko) (Picci i sur., 1987; Zrira i sur., 2003), δ-3-karen (65 %, Egipat) (De Pooter i sur., 1991) i α -terpineol (13 %, Izrael) (Fleisher i Fleisher, 1992).

Fernandez i sur. (2000) su odredili sastav eteričnog ulja tršlje u u kojem su najzastupljeniji spojevi iz skupine seskviterpena (47 %), čije su dominantne sastavnice: *trans*-kariofilen, τ-kadinen i germakren D. Istraživanjem uzoraka tršlje porijeklom iz Alžira, Djenane i sur. (2011) su kvantificirali 57 sastavnica što predstavlja ukupno 98,69 % sastava eteričnog ulja, od čega su sastavnice u najvišem postotku bile β-mircen (15,8 %), 1,8-cineol (15,02%), terpinen-4-ol (6,41 %), α-pinen (5,54 %) i β-pinen (5,10 %).

## 2.4. Biološka svojstva ekstrakata i eteričnih ulja tršlje

### 2.4.1. Antioksidacijski učinci BAM-a tršlje

Antioksidansi su tvari prisutne u niskim koncentracijama, koje vezujući se sa supstratom podložnim oksidaciji odgađaju ili sprečavaju njegovu oksidaciju čime postižu ravnotežu nesparenih elektrona i neutraliziraju potencijalno štetno djelovanje slobodnih radikala, a da pri tome ne dolazi do njihove nestabilnosti.

Slobodni radikali su nestabilne kemijske čestice koje nisu samo štetne, već i prijeko potrebne tvari za neometano funkcioniranje organizma, a nastaju kao međuprodukt aerobnog metabolizma. Tijekom uravnoteženih uvjeta u organizmu uloga slobodnih radikala je međustanična komunikacija i obrana od bakterija i drugih štetnih agensa, ali ukoliko dođe do neravnoteže i nagomilavanja slobodnih radikala za posljedicu ima razvitak karcinogeneze i kroničnih degenerativnih procesa u ljudskom tijelu (Lacković, 2001; de Graft-Johnson i sur., 2007).

Zbog velike toksičnosti sintetskih (npr. butilhidroksitoluen, butilhidroksianisol), povećao se interes za istraživanjem prirodnih antioksidansa kao što su fenolni spojevi (fenolne kiseline i flavonoidi) i eterična ulja te je provedeno više istraživanja vezano uz njihovu kemijsku strukturu i aktivnost u voću, povrću, žitaricma i biljkama (Shahidi, 2000).

Fenolni spojevi su antioksidansi s dobrom redukcijskom sposobnošću, dobri su „hvatači“ slobodnih radikala, dobro keliraju ione prijelaznih metala ($Fe^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$ i $Mg^{2+}$) i dobri su inhibitori peroksidacije lipida (Villaño i sur., 2007; Rodríguez Vaquero i sur., 2007). Razlike u aktivnosti pojedinih fenolnih spojeva u pravilu se povezuju sa strukturnim razlikama između molekula, broju i položaju OH skupina i dvostrukih veza (Amić i Lučić, 2010). Prema Kazazić (2004), mehanizam djelovanja flavonoida u biološkim sustavima na molekulskoj razini nije u potpunosti razjašnjen zbog njihovih različitih kemijskih svojstava i strukturalne heterogenosti.
Rezultati istraživanja mnogih autora (Gardeli i sur., 2008; Cherbal i sur., 2012; Bampouli i sur., 2014) potvrđuju značajne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta lista tršlje te samim time i značajne masene udjele antioksidansa. U istraživanju Remila i sur., (2015) provedenom na svježim ekstraktima lista tršlje rezultati pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet čije vrijednosti iznose 5865 ± 406 μmol TE/100 g ekstrakta mjerene ORAC metodom što su potvrdili i Zitouni i sur., (2016) u istraživanju provedenom u metanolnim i butanolnim ekstraktima dobivenim iz lista tršlje.

Antiokisdativni kapacitet etanolnih ekstrakta listova tršlje je posljedica prisutnosti širokog spektra fenolnih kiselina, od kojih je najzastupljenija galna kiselina i njeni derivati (5-*O*-galoil, 3,5-*O*-digaloil i 3,4,5-tri-*O*-galoilkina kiselina) (Benhammou i sur., 2008).

Koristeći UHPLC-ESI-HMRS za analizu glavnih sastavnica ekstrakta dobivenog iz svježeg lista tršlje, Bampouli i sur. (2014) su identificirali glavne sastavnice i to izomere galoil kinične kiseline, D-galokatehin, miricietin-ramnozid, izomere kvercitin glikozida, neoramnozid, izomere kamferol glukozida i luteolin, te zaključili da upravo zbog navedenih sastavnica ektrakti tršlje posjeduju jaku antioksidacijsku aktivnost.

Osim ekstrakata koji sadrže značajne udjele fenolnih kiselina, eterična ulja također pokazuju antioksidacijsku aktivnost zbog kemovarijabilnosti terepenskog sastava i njihove koncentracije.

U istraživanju antioksidacijskog kapaciteta eteričnog ulja iz lista tršlje, Auouinti i sur. (2013) su potvrdili visoki antioksidacijski kapacitet koji je uzrokovan monoterpenskim ugljikovodicima i oksidiranim monoterpenima kao što su α-pinen, β-pinen, δ-3-karen i β-mircen.

Ulje dobiveno prešanjem bobica tršlje iskazuje antioksidativnu sposobnost zbog svog sastava u kojem su najzastupljenije fenolne kiseline kao što su *p*-hidroksibenzojeva, ferulinska, siriginska, *p*-kumarinska, galna i protokatehinska kiselina (Chouaibi i sur., 2015).

### 2.4.2. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja tršlje

Antimikrobna svojstva biljaka i njihovih metabolita su predmet brojnih istraživanja zbog rastuće učestalosti patogena koji su otporni na postojeće antimikrobne lijekove, te zbog njihove učinkovitosti, niske toksičnosti i zanemarivih nuspojava. Antibiotici imaju više načina djelovanja, a prema mjestu djelovanja dijele se na:

a) Inhibitore sinteze stanične stijenke (penicilini, cefalosporini, cikloserin, bacitracin)- onemogućavaju umrežavanje peptidoglikanskog sloja stanične stijenke bakterija što kao posljedicu uzrokuje autolizu stanice
b) Inhibitore biosinteze proteina (antibiotici širokog spektra djelovanja - tetraciklini, streptomicin, kloramfenikol)- onemogućavaju proces očitavanja amino kiselina i sintezu peptida sa mRNA u ribosomima

c) Inhibitore funkcije DNA (antitumorni antibiotici - aktinomicin, bleomicin, daunomicin)- onemogućavaju sintezu nukleozida, replikaciju DNA, transkripciju mRNA na DNA kalupu
d) Antibiotike koji se vežu na citoplazminu membranu (polipeptidni antibiotici- gramicidin, polimiksin, nisin)- uzrokuju disfunkcije citoplazmine membrane (osmotska barijera) i nekontrolirani prolaz otopljenih molekula u i iz stanice (Šušković i Kos, 2007; Šušković i Kos, 2017)

Antimikrobna svojstva pojedinih eteričnih ulja i njihovih sastojaka se kontinuirano istražuju, a sam mehanizam njihova djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Burt, 2004). Kako u stanici mikroorganizma postoji više ciljanih mjesta, više je i mehanizama antibakterijskog djelovanja (Carson i sur., 2002) pri čemu valja naglasiti da su ispitivanja antimikrobne aktivnosti ukazala na utjecaj OH skupina vezanih na fenolne komponente eteričnog ulja (Burt, 2004). Bez obzira što se najzastupljenijim sastavnicama najčešće pripisuje antimikrobno djelovanje, istraživanja provedena na eteričnim uljima kadulje, timijana i origana pokazala su kako i manje zastupljeni sastojci eteričnog ulja mogu imati značajnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti, što se pripisuje sinergističkom djelovanju svih sastavnica (Burt, 2004; Bakkali i sur., 2008; Stojković i sur., 2013).

Antimikrobna aktivnost fenolnih spojeva posljedica je različitih i međusobno isprepletenih mehanizama djelovanja, pri čemu vrsta mikroorganizma i njegova građa također imaju važnu ulogu (Cown, 1999; Shan i sur., 2007). Fenolni spojevi mogu denaturirati enzime (Furneri i sur., 2002) ili se vezati na vitamine, minerale ili ugljikohidrate čineći tako nedostupnim navedene supstrate koji su nužni za rast mikroorganizma (Stern i sur., 1996; Shahidi i Naczk, 2004).

Osim istraživanja provedenim na antibakterijskom i antifugalnom djleovanju fenolnih spojeva, pojedini autori ističu i njihovu dobru antiviralnu i insekticidnu aktivnost (Rauha, 2001; Friedman i sur., 2001; Ojimelukwe i Alder, 1999; Lee i sur., 2001; Karemu i sur., 2013; Bougherra i sur., 2015).

Prema istraživanju Pham-Huy i sur. (1999), antimikrobni učinak eteričnog ulja lista tršlje je dokazan na gram-pozitivnim bakterijama *Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii* i gram-negativnim bakterijama *Porphyrmonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* te *Prevotella intermedia*.

Rezultati istraživanja koje su proveli Aouiniti i sur. (2013) pokazali su da eterično ulje lista tršlje dobiveno vodenom destilacijom iz marokanske regije Jerada pokazuje najjaču antibakterijsku aktivnost prema gram-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus*, pa zatim prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*.

Također, različita istraživanja pokazuju da vodeni (Hayder i sur., 2005), etanolni i etil acetatni (Kordali i sur., 2003) ekstrakti lista tršlje imaju antibakterijska svojstva.

Osim eteričnog ulja lista tršlje, antibakterijski učinak je dokazan i u mastik gumi i ulju dobivenom hladnim prešanjem bobica na sojevima gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Lactobacillus plantarum*), te gram-negativnim bakterija (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhimurium, Pseudomonas fragi, Salmonella enteritidis, Helicobacter pylori*) (Marone i sur., 2001; Mezni i sur., 2014; Tassou i sur., 1995).

## 2.5. Čimbenici koji utječu na akumulaciju bioaktivnih molekula

Kako bi se uspješno razvijale i završile proces reprodukcije, biljke tijekom svojeg životnog ciklusa reagiraju prema nizu okolišnih čimbenika koji u samoj biljci stvaraju nepovoljne uvjete za rast i razvoj.

Okolišni čimbenici opisuju lokaciju rasta i fenološke faze biljke, a njihov utjecaj na biljku može biti biotički ili abiotički ovisno o tome što ili tko vrši stres nad biljkom u određenim okolišnim uvjetima.

Zbog nemogućnosti da izbjegne utjecaj nepovoljnih čimbenika (biotičkih i abiotičkih), biljka je razvila obrambene mehanizme koji uključuju enzimske i ne-enzimske antioksidanse. Enzimski antioksidativni sustav u biljaka uključuje superoskid dismutazu (SOD), askorbat peroksidazu (APX), ne-specifičnu peroksidazu (POD), glutation reduktazu (GR) i katalazu (CAT) i sl., dok ne-enzimski antioksidansi uključuju sekundarne metabolite, hormone, ROS i sl., koji su odgovorni za lokalnu obranu biljke u svrhu restrikcije oštećenja (Mantri i sur., 2012). Abiotički čimbenici uzrokuju oštećenje elektron transportnih puteva u kloroplastima i mitohondrijima (Prasad i sur., 1994), dok biotički čimbenici induciraju proizvodnju specifičnih ROS enzima kao što su plazma membranski NADPH oksidaza kompleks ili peroksidaze staničnog zida (Hammond-Kosack i Jones, 1996; Mittler, 2002).

Mnogobrojna istraživanja dokazuju aktivaciju enzimskih i ne-enzimskih obrambenih mehanizama kao odgovor biljke na utjecaj nepovoljnih čimbenika (Namdjoyan i sur., 2012). Mishra i sur. (2014) su dokazali da izlaganjem biljke *Withania somnifera Dunal* nepovoljnim uvjetima dodatkom kadmija u različitim koncentracijama, dolazi do aktivacije ne-enzimskih (ukupni fenoli, prolin, tokoferol, flavonoidi i ostali) i enzimskih (APX, POD, GR, CAT) antioksidansa, odnosno njihovim porastu u ovisnosti o koncentraciji kadmija kojoj je biljka izložena.

### 2.5.1. Biotički čimbenici

Biotički čimbenici uključuju žive organizme kao što su biljke, mikroorganizmi (gljive, bakterije i virusi) i biljojedi, a koji utječu na rast i proizvodnju sekundarnih metabolita biljke (Vivanco i sur., 2005).

Mikroorganizmi utječu na proizvodnju bioaktivnih molekula i aktivaciju enzima unutar različitih dijelova biljke i tijekom različitih razvojnih faza (Zeng i sur., 2013; Vivanco i sur., 2005). U prirodi, napad mikroorganizama na biljnu vrstu je sastavni dio životnog ciklusa biljke koji za posljedicu ima povećanu koncentraciju sekundarnih metabolita koja se javlja kao obrambeni odgovor biljke na mikrobnu kolonizaciju (Suzuki i sur., 2014; Toussaint, 2007). U novije vrijeme, mnogobrojna istraživanja su se usmjerila na namjerno nacjepljivanje kultivara mikroorganizmima s ciljem dobivanja biljnog materijala bogatog sekundarnim metabolitima (Capellari i sur., 2013; Lingua i sur., 2013; Latha i sur., 2009; Chithrashree-Udayashankar i sur., 2011). Prema istraživanju Baslam i Goicoechea (2011), primjećen je značajan porast karotenoida i ukupnih antocijanina u salati (*Lactuca sativa* L.) kao posljedica inokualcije kultivara s smjesom mikoriznih gljiva *Glomus mosseae* i *Glomus intraradices,* dok inokualcija korijandera s *Glomus macrocarpum* ili *Glomus fasciculatum* je dovela do značajnog porasta monoterpena (α-pinena, β-pinena i *p*-cimena) i seskviterpena (β-kariofilen) (Kapoor i sur., 2002).

Prisutnost biljojeda biljke detektiraju pomoću residualnih izlučevina zaostalih u rani nakon ugriza, nakon čega dolazi do proizvodnje toksičnih sekundarnih metabolita, repelenata i lako hlapivih spojeva (aldehidi, alkoholi, esteri, terpenoidi) (Vivanco i sur., 2005). Nakon napada, biljka emitira nastale hlapive spojeve koji uzrokuju povećanje razine rezistentnosti same biljke (Karban i sur., 2006; Frost i sur., 2007; Heil i Silva Bueno, 2007), ali i prilagodbu okolnih biljaka na

potencijalni napad (Karban i sur., 2014). Međubiljna signalizacija uzorkovana napadom biljke insektima se vrlo uspješno koristi u organskoj agrokulturi jer dolazi do smanjenja upotrebe kemikalija što je dokazano istraživanjem koje su proveli Young i sur., (2005) koristeći insekticide piretin (organski) i permetrin (konvencionalni) tijekom rasta repe (*Brassica rapa* L.) kako bi se zaustavio napad buha. Rezultati provedenog istraživanja su pokazali da organski insekticid piretin nije imao učinka na buhe ali njihovim napadom je došlo do značajnog povećanja koncentracije ukupnih fenolna.

Pretraživanjem trenutno dostupne znanstvene literature nisu nađeni podaci o utjecaju biotičkih čimbenika na BAM i antioksidacijsku aktivnost lista tršlje.

### 2.5.2. Abiotički čimbenici

Abiotički čimbenici (fizički ili kemijski) predstavljaju sva svojstva i značajke neživoga okoliša koji posrednim ili neposrednim djelovanjem utječu na žive organizme uzrokujući stresno stanje, a općenito se dijele na:

- klimatske čimbenike: sunčeva svjetlost, temperatura, vlažnost i zrak;
- edafske čimbenike: fizikalna, kemijska i biološka svojstva tla, matične stijene i matičnog supstrata tla;
- orografske ili fiziografske čimbenike: svojstva reljefa (nadmorska visina, nagib terena, ekspozicija, razvedenost reljefa i dr.).

Abiotički čimbenici međusobno mogu utjecati jedni na druge, a najčešće predstavljaju kombinirani oblik stresa jer u većini slučajeva se radi o simultanom utjecaju nekolicine čimbenika na biljku u određenom staništu.

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da koncentracija bioaktivnih molekula i antioksidacijska aktivnost ovise o čimbenicima kao što su lokacija (Kaur i sur., 2015), vrijeme branja (Cheel i sur., 2013), genetici (Pirabalouti i sur., 2013) i fenološkim fazama biljke (Salami i sur., 2017). Kako su biljke sesilni organizmi ne mogu izbjeći štetne okolišne čimbenike nego im se pokušavaju prilagoditi (Hasanuzzaman i sur., 2016).

Abiotički čimbenici kao što su promjene temperature i svjetlosti te količna padalina uvelike utječu na sastav bioaktivnih molekula tijekom određene fenološke faze biljke i samim time direktno utječu na termin branja. Termin branja biljnog materijala se određuje i optimira s ciljem postizanja

maksimalnog prinosa bioaktivnih molekula tijekom ekstrakcije, rezultat je utjecaja klimatskih čimbenika, odnosno svakodnevnog stanja svjetla, temperature, oborina, vlage, vjetra i tlaka zraka na nekom staništu ili širem području (Lemos i sur., 2015).

U tršlji s otoka Zakynthos, Grčka, najviše monoterepena je određeno uzorcima ubranim u fazi cvjetanja biljke, kada je određen i najveći udio ukupnih fenola (588 ± 32,7 mg GAE/g uzorka) te najveći antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom (131,4 ± 10,1 mmol $Fe^{2+/}$L) (Gardeli i sur., 2008).

Utjecaj ***stupnja zrelosti*** plodova tršlje na količinu BAM-a koje su proveli Boudieb i sur. (2019) je pokazalo da se maseni udjeli ukupnog fenolnog sastava, mineralni sastav, količina pepela i iskorištenje ulja značajno razlikuju između ulja zrelih i ne-zrelih bobica. Maseni udio ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima dobivenim iz ne-zrelih bobica iznosila je 252,38 mg GAE/g st, dok je u metanolnim ekstraktima dobivenim iz zrelih bobica iznosio 503,87 mg GAE/ g st. Ne-zrele bobice su se pokazale bogatijima u količini pepela (3,68 %) od zrelih bobica (2,98 %), a akumulacija glavnih minerala u bobicama, kalija i natrija, se također razlikovala ovisno o stupnju zrelosti. Naime, povećanjem stupnja zrelosti maseni udjeli oba određivana minerala se smanjio i to natrija sa 323,2 na 114,9 mg/kg, a kalija s 1,38 na 1,30 mg/kg.

Istraživanje utjecaja ***termina branja*** (veljača, svibanj i kolovoz) na iskorištenje i sastav eteričnog ulja i metanolnih ekstrakta lista tršlje, je pokazalo da iskorištenje eteričnog ulja ne ovisi o teminu berbe, već da termin berbe uzrokuje različiti kemijski sastav eteričnog ulja. Eterično ulje dobiveno tijekom faze cvatnje (svibanj) je imalo najveći udjel monoterpenskih ugljikovodika (68,3 %), te najniži maseni udio oksidiranih monoterpena (13,3 %) i seskviterpena (9,2 %). Tijekom faze dozrijevanja ploda u kolovozu rezultati analize uzetih uzoraka su pokazali da povećanje koncentracije sekviterpena i pad masenih udjela monoterpenskih ugljikovodika.

U metanolnim ekstraktima tršlje dobivenim iz lista tršlje najvieći maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorcima ubranim tijekom tijekom faze cvjetanja u svibnju (588 mg GAE/ g st), a najmanji u uzorcima ubranim tijekom veljače (Gadeli i sur., 2008).

Fitokemijski sastav tršlje ovisi i o ***tipu tla***, što su dokazali Llorens-Molina i sur. (2015) u istraživanju sastava eteričnih ulja dobivenih iz lišća tršlje ubranog s dva različita tipa tla u Valenciji i Španjolskoj, u kojima su prevladavali slični klimatski uvjeti. Uočena je razlika u najzastupljenijim komponentama eteričnih ulja, tako da seskviterpeni prevladavaju u uzorcima koji su rasli na silikatnom tlu (39,9 %), dok su u uzorcima s vapnenog tla zastupljeniji monoterpeni (57,5 %).

***Nadmorska visina*** je okolišni faktor koji izravno utječe na morfologiju i sastav biljke kako bi se biljka obranila od oštećenja i prilagodila stresnim uvjetima (Kofidis i Bosabalidis, 2008), a uključuje promjene drugih okolišnih čimbenika kao što su temperatura zraka, padaline, vjetar, sastav tla, duljina izlaganja sunčevoj svjetlosti, temperaturne promjene dan/noć te jačina i trajanje ultraljubičastog zračenja.

Prema istraživanju Said i sur. (2011), promjena nadmorske visine je uzrok kemovarijabinosti eteričnog ulja dobivenog iz lista tršlje. Istraživanje je provedeo na uzorcima lista tršlje koji su brani na različitim nadmorskim visinama: niskim (6 - 154 m), srednje-niskim (121 - 307 m) i visokim (809 - 1042 m). Kvanitificirani sastav ulja primjenom GC/MS analize je pokazao da eterična ulja s niskih i srednje-niskih nadmorskih visina ima gotovo pa identičan sastav s najzastupljenijim sastavnicama: δ-kadinen, β-kariofilen i kubebol, dok eterično ulje dobiveno iz uzorka ubranim na nadmorskoj visini od 809-1042 m je pokazalo da su najzastupljenije sastavnice kao δ-kadinen, β-kariofilen i α-pinen. Također, pomoću Tukey testa su dokazali da povećanjem visine, dolazi do povećanja ukupnih ugljikovodika eteričnog ulja lista tršlje.

***Količina padalina*** pokazala se kao faktor koji je utjecao na fitokemijski sastav analiziranih eteričnih ulja dobivenih iz tršlje uzetih sa tri lokacije u Tunisu u istraživanju koje su proveli Bachrouch i sur. (2015). Uzroci tršlje uzeti su s različitih područja koja su kategorizirana na vlažno, poluvlažno i polusuho. Rezultati provedenih analiza su pokazali da su u eteričnom ulju dobivenom iz uzoraka s polusuhog područja najzastupljeniji monociklički monoterpen limonen te biciklički monoterpeni α-pinen i α-felandren. U eteričnom ulju dobivenom iz uzoraka uzetih s vlažnog područja najzastupljeniji je seskviterpen β-kariofilen, dok u uzorcima uzetih s poluvlažnog područja prevladavaju monociklički monoterpeni terpinen-4-ol i α-terpineol.

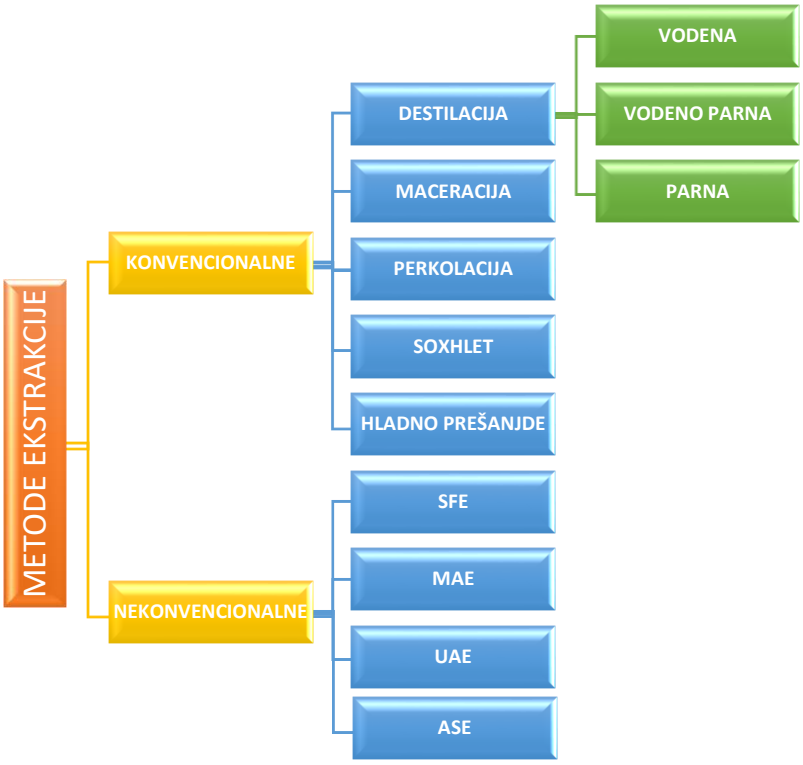
***Salinitet*** je jedan od većih abiotičkih stres faktora koji utječe na rast i reproduktivnost biljke. Poznato je da je tršlja rasprostranjena po pretežno suhom i toplom Mediteranskom području te da je stoga adaptirana na neplodna tla i ekstremne vremenske uvjete poput dugih razdoblja suše. Cristiano i sur. (2016) su u svojem istraživanju ispitivali utjecaj saliniteta na fiziologiju tršlje u kontroliranim uvjetima. Osim što je porast saliniteta utjecao na smanjenje vrijednosti promatranih morfoloških i fizioloških parametara (visina biljke, broj listova na stabljici, duljina korijena, ukupna biomasa) pokazalo se da je tršlja izrazito prilagodljiva biljka koja može tolerirati i akumulirati sol pri visokim koncentracijama stoga je njen uzgoj potencijalno pogodan za obnavljanje napuštenih agrokulturnih područja (npr. uslijed nepogodnog saliniteta tla).

Rezultati jednog od opsežnijih istraživanja utjecaja ***svjetlosti i hlada***, ***suše*** i ***dostupnosti vode*** na tršlju su prikazani u radu koji je proveo Valladares (2004). Njegovi rezultati su pokazali da tršlja pod direktnim utjecajem svjetla smanjuje transpiraciju za 40 % što joj omogućuje duže preživljavanje tijekom sušnih razdoblja. Također, zbog stresnih uvjeta uzrokovanih sušom, tršlja vrlo brzo troši vodu iz zemlje, čime dolazi do bržeg odumiranja biljke. Ovim istraživanjem su također potvrđeni rezultati Vilagrosa i sur. (2003) da uzorci tršlje uzgajani u hladu imaju dulji životni vijek , te da nakon kavitacije i implozije ksilema uzrokovanih sušom, dostupnost vode omogućava brzi biljci oporavak i proizvodnju mladih grančica.

## 2.6. Ekstrakcija bioaktvnih molekula

Upotreba biljaka u svrhe prevencije različitih oboljenja ima dugu povijest širom svijeta te se tijekom stoljeća razvijaju bolje metode za pripremu takvih materijala. Danas postoji sve veći interes za prirodne lijekove kao nadomjestak lijekovima koji se koriste u klasičnoj medicini, a ljekovito i aromatsko bilje predstavlja neiscrpan izvor sirovog materijala za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju te se sve češće koristi u agrokulturi za suzbijanje štetočina i nametnika (Rice, 1995).

Ekstrakcija je tehnološki postupak izdvajanja bioaktivnih molekula iz svih dijelova biljnog materijala pomoću otapala primjenom konvencionalnih ili ne-konvencionalnih metoda. Postupak ekstrakcije predstavlja ključni korak u izolaciji BAM-a iz biljnih materijala. BAM se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli. Odabirom prikladne metode ekstrakcije fenolnih spojeva treba voditi računa o topljivosti spojeva koje se želi ekstrahirati te odabrati pogodno otapalo. Na ekstrakciju fenolnih spojeva utječu brojni čimbenici kao što su: vrsta otapala, fizikalno-kemijska svojstva uzorka iz kojeg se izoliraju spojevi, omjer uzorka i otapala te vrijeme i temperatura ekstrakcije (Veggi i sur., 2013). Zbog značajnih razlika u biološkoj aktivnosti i strukturi fenolnih spojeva, neophodno je odabrati ekstrakcijsku metodu koja će osigurati najveću moguću koncentraciju željene tvari uz minimalnu degradaciju ovih spojeva (Gupta i sur., 2012). Najčešće primjenjivane metode ekstrakcije su konvencionalne, makar se sve više provode istraživanja koristeći nekovnecionalne metode koje su u skladu s načelima zelene kemije (*Slika 9*).




***Slika 9***. Podjela metoda ekstrakcije

### 2.6.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Konvencionalne metode ekstrakcije temelje se na pravilnom izboru otapala, uz zagrijavanje i/ili miješanje kako bi se povećala topljivost ciljanih spojeva te povećao prijenos mase (Mandal i sur., 2007). Tehnologije konvencionalne ekstrakcije za izolaciju BAM iz biljnog materijala uključuju maceraciju, perkolaciju, destilaciju, Soxhlet ekstrakciju i hladno prešanje.

Zbog različitosti biljnih BAM-a i njihove topljivosti u otapalima, upotreba optimalnog otapala ovisi o sastavu biljnog materijala iz kojeg se želi izolirati. Najčešće korištena otapala su metanol (Ross i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011), etanol (Altiok i sur., 2008; Ross i sur., 2009; Wang i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011), aceton (Naczk i Shahidi, 2006; Altiok i sur., 2008) te etil acetat i njihove vodene otopine, koje su se pokazale kao najučinkovitije u izolaciji BAM-a iz biljnog materijala.

Metanol je učinkovitiji za ekstrakciju fenolnih spojeva nižih molekularnih masa, dok aceton za ekstrakciju flavanola viših molekularnih masa iz voća (Metivier i sur., 1980; Labarbe i sur., 1999; Prior i sur., 2001; Guyot i sur., 2001). Prilikom ekstrakcije suhog biljnog materijala

učinkovitijim se pokazalo ono otapalo koje sadrži veći udio vodene faze u organskoj (Bimakr i sur., 2011). Zbog toksičnosti metanola, za industrijske potrebe prilikom ekstrakcije BAM-a danas se više koriste etanol ili vodene otopine etanola.

Truong i sur. (2019) su na biljci *Severinia buxifolia* istražili utjecaj različitih otapala na iskorištenje BAM-a. Ekstrakcija BAM-a je izvršena konvencionalnim postupkom ekstrakcije zagrijavanjem različtih otapala i rezultati istraživanja su pokazala da je metanol najučinkovitije otapalo za ektrakciju BAM-a (33,2 %), od kojeg su se pokazali manje učinkoviti destilirana voda (27,0 %), etanol (12,2 %), aceton (8,6 %), kloroform (7,2 %) i diklormetan (4,9 %).

Za razliku od uporabe čistog etanola ili acetona, prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala značajno povećava proces difuzije i olakšava ekstrakciju BAM-a iz biljnog materijala (Mohammedelnour i sur., 2017).

Na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala osim izbora i polarnosti ekstrakcijskog otapala značajan utjecaj ima temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije koji utječu na topljivost i razgradnju analita (Robards, 2003).

Povišenjem temperature ekstrakcije dolazi do povećane topljivosti i većeg prijenosa mase (Bucic-Kojić i sur., 2007; Harbourne i sur., 2009; Spigno i sur., 2007). Također, viša temperatura može utjecati na matricu biljke na način da dolazi do povećanja propusnosti staničnog zida i slabljenja interakcija između fenolnih spojeva i makromolekula (proteini, polisaharidi) čime se ubrzava ekstrakcijski proces (Prasad i sur., 2009; Al Farsi i Lee, 2007). Fenolni spojevi vrlo lako podliježu hidrolizi i oksidaciji pa predugo vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura značajno utječu na njihovu stabilnost uzrokujući kemijsku, enzimsku ili termalnu degradaciju (Fischer i sur., 2013; Cisse i sur., 2012).

Dent i sur. (2013) su istražili utjecaj temperature (60 i 90 °C), otapala (30%, 50 %, 70 %-tne otopine etanola i acetona, destilirana voda) i vremena ekstrakcije (30, 60, 90 min) na ekstrakciju fenolnih spojeva iz dalmatinske samonikle kadulje (*Salvia officinalis* L.), te zaključili da najučinkovitiji parametri za ekstrakciju fenolnih spojeva su 30 %-tna otopina acetona ili etanola, temperatura od 60 °C, te vrijeme ekstrakcije od 30 min.

Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije su: degradacija bioaktivnih komponenti zbog visokih temperatura ili predugog trajanja ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010), hidroliza ili oksidacija bioaktivnih molekula, te velike utrošene količine upotrijebljenog otapala.

Unatoč tome, konvencionalne metode se i dalje najčešće koriste zbog njihove jednostavnosti i učinkovitosti.

### *Destilacija*

Destilacija je toplinski separacijski proces u kojem dolazi do razdvajanja višekomponentnih smjesa na temelju različitih hlapljivosti, odnosno na temelju različitih vrelišta pojedinih komponenata. Unatoč niskoj termodinamičkoj učinkovitosti, proces destilacije je najzastupljeniji separacijski proces u kemijskoj industriji zbog mogućnosti separacije smjesa s velikim rasponom koncentracija te zbog dobivanja produkta visoke čistoće.

Postoje 3 vrste destilacija: vodena, vodeno-parna, parna. U svim navedenim destilacijama, statična posuda se puni biljnim materijalom, dodaje se voda u zadanoj količini koja se dovodi do vrenja. Nastala vruća voda i para djeluju kao glavni faktori za oslobođenje BAM-a iz biljnog tkiva. Trajanje destilacije ovisi o vrsti biljnog materijala. Tako je vrijeme destilacije oko 60 minuta kod destilacije lavande, kod destilacije borovih iglica je oko 3 sata, destilacija sandalovog drva traje i više od 100 sati, dok destilacija ploda borovice, lišća tuje ili cvijeta smilja traje oko 90 min.
Neovisno o tehnološkoj izvedbi destilatora, svaki uređaj za destilaciju ima ove osnovne dijelove:

1. parogenerator - dio za proizvodnju vodene pare,
2. kotao za destilaciju - dio s biljnim materijalom kroz koji prolazi para,
3. kondenzator - dio u kojem se ukapljuju vodena para i eterično ulje hlađenjem,
4. separator - dio u kome se odvajaju eterično ulje i vodeni sloj

Pravilnim korištenjem, bez obzira na upotrijebljenu vrstu destilacije, glavni proizvod je eterično ulje visoke čistoće uz koje se dobiva i vodena otopina zasićena sastavnicama eteričnog ulja koja se naziva cvjetna vodica ili hidrolat. Nakon odvajanja, eterično ulje i hidrolat se moraju stabilizirati tj. odstajati neko vrijeme u staklenim bocama.

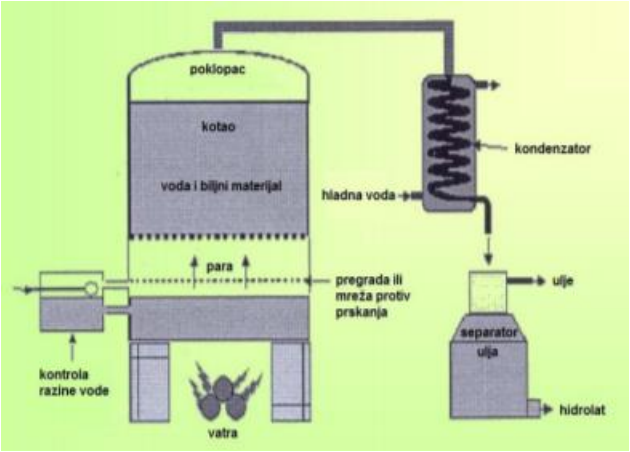
### *Vodena destilacija*

Vodena destilacija je najjednostavniji oblik destilacije koji se provodi postavljanjem usitnjenog biljnog materijala u vodu uz zagrijavanje do ključanja vanjskih izvorom topline, najčešće pri atmosferskom tlaku. Pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju (Jerković, 2008). Nedostaci vodene destilacije su dugotrajnost procesa, potrošnja energije za zagrijavanje, te degradacija biljnog materijala uzorkovana izvorom grijanja. Produljeni kontakt

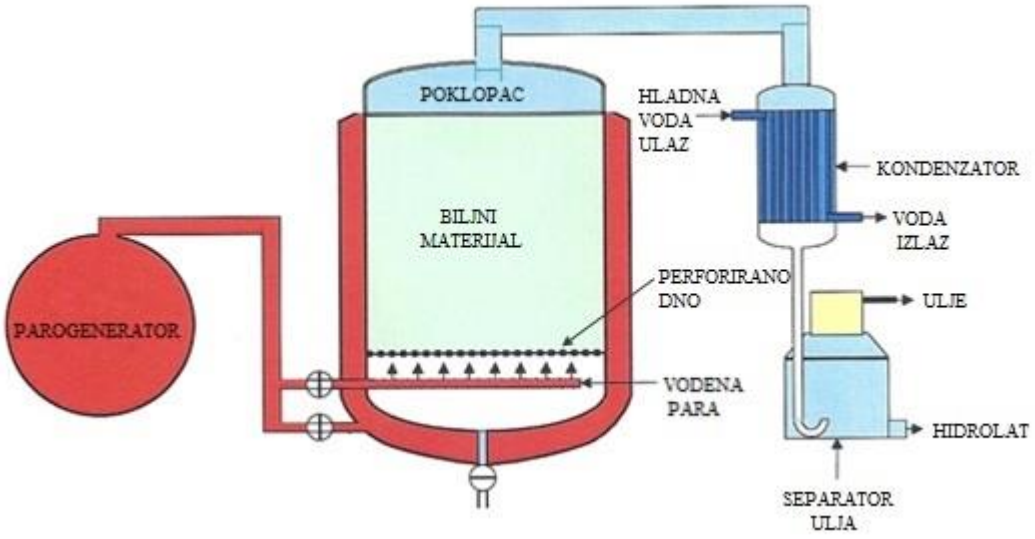
eteričnog ulja s vrućom vodom može dovesti do hidrolize spojeva. Prednosti su visoki prinosi i jednostavnost postupka.

***Vodeno-parna i parna destilacija***

Destilacija ***vodenom parom*** se često upotrebljava kao metoda za izolaciju i čišćenje organskih tvari, a temelji se na svojstvu mnogih spojeva da hlape zajedno s vodenom parom, pri temperaturi znatno nižoj od njihova vrelišta (100 °C). Biljni materijal postavlja se na perforiranu podlogu na određenu udaljenost od dna posude koja je ispunjena vodom. Kotao se zagrijava vanjskim izvorom topline čime dolazi do nastajanja vodene pare koja prolazi kroz usitnjeni biljni materijal. Prilikom prolaska pare kroz biljni materijal dolazi do oslobađanja čestica eteričnog ulja. Nastala smjesa prolazi kroz hladilo gdje se kondenzira, te na kraju procesa se sakuplja u separatoru (*Slika 10*) (Rapić, 2008). Važno je da uzorak ne bude previše usitnjen, kako bi pare mogle jednolično prolaziti kroz biljni materijal. Unutar separatora (Fiorentinska boca) dolazi do formiranja 2 sloja. Gornji sloj je eterično ulje koje se nalazi na površini pošto je ulje lakše i netopivo u vodi, dok je donji sloj hidrolat (Krešić, 2014). Ova vrsta izolacije je kraća u odnosu na vodenu destilaciju, ima bolje iskorištenje, te je ekonomičnija. ***Parna destilacija*** se razlikuje od destilacije vodenom parom u tome što se biljni materijal ne nalazi u istom kotlu kao i voda, već je izvor pare vanjska jedinica kao parogenerator koji proizvodi zasićenu ili pregrijanu paru, najčešće kod povišenih tlakova, a uvodi se sa dna kotla. Nedostatak ove metode je povećana mogućnost stvaranja spojeva koji nisu izvorno prisutni u biljci, a nastali su zbog termičkih degradacijskih reakcija, osobito hidrolize (Jerković, 2008) (*Slika 11*).




***Slika 10.*** Vodeno-parna destilacija (Talati, 2017)




***Slika 11***. Shematski prikaz parne destilacije (Powell, 2018)

Brojna istraživanja usporedbe izolacije eteričnih ulja putem konvencionalne parne destilacije i nekonvencionalnih metoda, su pokazala da parna destilacija unatoč svojim nedostacima, pruža najpotpuniju izolaciju sastavnica ulja.

Prema istraživanju od Jablonský i sur. (2016), parna destilacija je najučinkovitija metoda ekstrakcije za kvantificiranje identifikaciju sastavnica eteričnog ulja lavande u usporedbi s Soxhlet ektrakcijom i ASE. Unatoč tome što je najveće iskorištenje postignuto primjenom Soxhlet ekstrakcije (20,01 %), potom ASE-a (7,12 %), parna destilacija s iskorištenjem od 1,40 % je omogućila izolaciju sastavnica eteričnog ulja kao što su linalol, terpinen-4-ol, α-terpineol i linalol oksida, a koje nisu izolirane ekstrhiranjem putem Soxhleta i ASE-a.

U istraživanju prema Congiu i sur. (2002), vodena destilacija se pokazala kao efikasnija metoda izolacije određenih sastavnica eteričnog ulja lista i bobica tršlje. U istraživanju su usporedili konvencionalnu vodenu destilaciju (VD) i ne-konvencionalnu superkritičnu fluidnu ekstrakciju (SFE) lista i bobice tršlje. Kvantificiranje sastavnica GC/MS analizom je pokazalo velike razlike u sastavu ovisno o metodi ekstrakcije i dijelu biljke iz kojega je ulje izolirano, a prikazane su u *Tablici 3*.

***Tablica 3.*** Glavne sastavnice eteričnog ulja tršlje dobivenog iz lista i bobica pomoću ekstrakcije superkritičnim fluidima (SFE) vodene destilacije (VD) (Congiu i sur., 2002)

| SASTAVNICE (%) | BOBICE | | LIST | |
|---|---|---|---|---|
| **α-pinen** | 8,33 | 8,89 | - | 0,21 |
| **kamfen** | - | 2,22 | - | 8,69 |
| **β-pinen** | 3,02 | 3,95 | 0,87 | 18,71 |
| **mircen** | 56,13 | 46,72 | - | - |
| **α-felandren** | 0,75 | 0,82 | - | 1,70 |
| **δ-3-karen** | 0,79 | - | - | - |
| **α-terpinen** | - | 1,03 | - | 1,87 |
| **limonen** | - | - | 3,68 | - |
| **β-felandren** | 6,00 | 7,05 | - | 12,63 |
| **pentil izobutirat** | 1,90 | - | 1,10 | - |
| **γ-terpinen** | - | 1,69 | - | 3,89 |
| **4-terpineol** | - | 0,43 | 0,42 | 1,22 |
| **α-terpineol** | - | 0,62 | 0,78 | 1,61 |
| **izopentil heksanoat** | 0,35 | - | 2,72 | - |
| **β-kariofilen** | 1,87 | 3,35 | 31,38 | 13,22 |

***Maceracija***

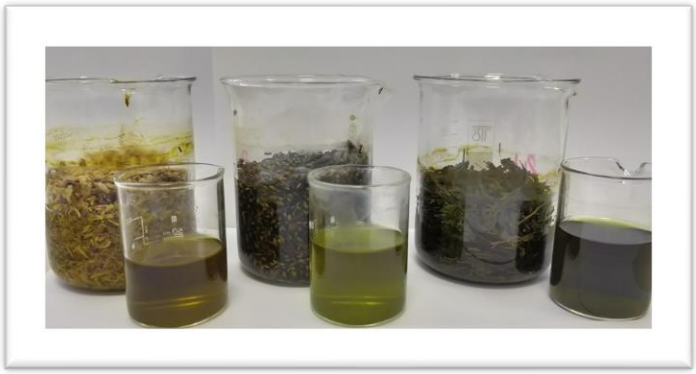
Maceracija je konvencionalni način ekstrakcije koji se zasniva na principu molekularne difuzije, što ju čini jednostavnom i jeftinom metodom za ekstrakciju BAM-a. U postupku maceracije jako je važan odabir otapala o kojem ovisi kvaliteta i uspješnost same ekstrakcije. Biljni materijal se usitnjava kako bi se povećala specifična površina biljnog materijala, a time i kontakt biljnog materijala s otapalom. Usitnjeni biljni materijal i otapalo se stavljaju u posudu, miješaju i ostavljaju da stoje na sobnoj temperaturi od nekoliko sati do nekoliko tjedana uz povremeno miješanje (*Slika 12 a* i *b*). Nakon završenog procesa maceracije, dobiveni macerat se iscijedi i filtrira kako bi se uklonile nečistoće, a zaostali biljni materijal se preša kako bi se oslobodilo

preostalo otapalo u biljnom materijalu. Najčešće upotrebljavanja otapala su voda, glicerol, ulja, propilen glikol, etanol i dr.

Gonçalves i sur. (2013) su istraživali utjecaj vruće i hladne vode prilikom izolacije bioaktivnih molekula iz list tršlje primjenom konvencinalne metode maceracije uz centrifugiranje. Rezultati su pokazali da prilikom macearacije s hladnom vodom ukupni fenolni sastav je niži (759,45 ± 74,38 µmol GAE/ g st) ukupnog fenolnog sastava koji je dobiven uz upotrebu vruće vode prilikom maceracije (1359,10 ± 33,18 µmol GAE/ g st).



a)



b)

***Slika 12 a i b.*** Ekstrakti dobiveni postupkom maceracije (vlastita fotografija)

### 2.6.1. Ne-konvencionalne metode ekstrakcije

Primjena suvremenih ekstrakcijskih metoda temelji se na principima zelene kemije. Zelena kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju

ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (Alfonsi i sur., 2008).

Za razliku od konvencionalnih metoda ne-konvencionalne metode ekstrakcije mogu se provoditi u uvjetima bez prisustva svjetla i kisika čime se omogućuje dobivanje sličnih ekstrakcijskih prinosa, ali u kraćem vremenskom periodu (Nayak i sur., 2015). Prednosti ne-konvencionalnih metoda je smanjena upotreba ekstrakcijskih otapala koja mogu izazvati onečišćenja okoliša, što ih čini ekološki prihvatljivijim od konvencionalnih metoda (Drosou i sur., 2015).

U suvremene ekstrakcijske metode pripadaju:

- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)
- Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE)
- Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)
- Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Uspoređivanjem iskorištenja eteričnog ulja iz dobivenog iz lista i bobica tršlje porijeklom iz dvije regije Sardinije (Costa Rey i Capoterra) dobivenog pomoću SFE i vodene destilacije, Congiu i sur. (2002) su dokazali da iskorištenje ekstrakcije ovisi o lokaciji biljke, dijelu biljke i metodi ekstrakcije. Njihovi rezultati su pokazali da je najveće iskorištenje dobiveno za eterično ulje lista tršlje, ekstrahirano vodenom destilacijom iz regije Costa Rey u iznosu od 0,45 %, dok je uzorak porijekom iz regije Capoterra imalo iskorištenje u iznosu od 0,28 %. Prilikom ekstrakcije bobica pomoću SFE i vodene destilacije, iskorištenje se nije razlikovalo i iznosilo je 0,20 %.

Bampouli i sur. (2014) s proveli istraživanje koristeći svježe i suhe listove *P.lentiscus* u kojemu su usporedili tri različite vrste ekstrakcije: konvencionalnu, MAE i UAE. Istraživanjem su dokazali da upotrijebljena metoda ekstrakcije ima veliki učinak na iskorištenje koje je variralo od 1,08 do 48,11, te 1,7 do 47,98 g ekstrakta/100 g ST za svježe i sušeno lišće tršlje. Statistička analiza je pokazala da na konvencionalnu metodu ekstrakcije znantno utječu polarna otapala voda i etanol, dok upotreba heksana ili etil acetata nije pokazala značajnu statističku razliku. Najučinkovitijim otapalom za konvencionalnu ekstrakciju svježeg lista tršlje se pokazala voda (31,99 ± 1,55 %), zatim etanol (19,34 ± 1,35 %). Konvencionalana ekstrakcija provedena manje polarnim otapalima, heksanom (1,08 %) i etil acetatom (3,88 %), je pokazala manja iskorištenja. Konvencionalna ekstrakcija provedena na suhom listu tršlje je pokazala da najučinkovitije otapalo je etanol s

iskorištenjem od 13,10 %. MAE provedena na suhim i svježim listovima tršlje koristeći vodu kao otapalo se pokazala kao najučinkovitija metoda s najvišim iskorištenjima (47,98 ± 0,69 % suhi listovi, 48,11 ± 0,56 % svježi listovi), bez značajne statističke razlike između upotrijebljenog biljnog materijala (suhog ili svježeg).

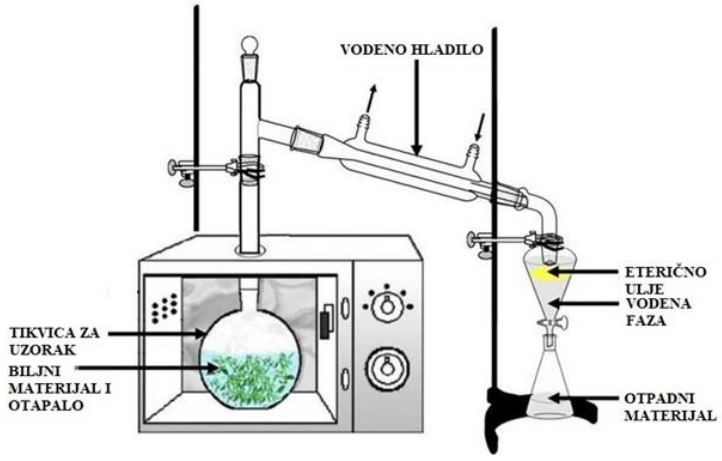
***Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)***

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) je brza i pouzdana analitička metoda koja koristi mikrovalove za ekstrakciju bioaktivnih molekula, te se smatra kao potencijalna alternativa tradicionalnoj kruto-tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju metabolita iz biljaka (*Slika 13*).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pripisuje se zelenoj kemiji zbog smanjenog ~~a~~ vremena i količine potrebnog otapala za ekstrakciju uz veće iskorištenje te manje potrebne energije. Upotrebom mikrovalnog zračenja izbjegava se razgradnja uzorka zbog primjene visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matriksa (Spigno i Faveri, 2009).

Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a prema Kaufmann i Christenu (2002) to su:

- ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi
- ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku




***Slika 13.*** Shematski prikaz ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Kusuma i Mahfud, 2016)

Sam princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na direktnom djelovanju mikrovalova na molekule ciljnog materijala. Transformacija elektromagnetske energije u toplinsku

se odvija kroz dva simultana mehanizma: rotaciju dipola i ionsku vodljivost u otapalu (Favretto, 2004).

Prilikom rotacije dipola dolazi do reorijentacije dipolnih molekula s brzo promjenjivim električnim poljem što dovodi do njihove vibracije i oslobađanja topline uslijed trenja. Ionska vodljivost se javlja ako su prisutni slobodni ioni ili ionske vrste u mediju na koji djeluje mikrovalno zračenje. Nadalje, zbog ionske vodljivosti dolazi do kretanja iona pod utjecajem izmjeničnog električnog polja pri čemu okolna otopina pruža otpor kretanju što također rezultira trenjem i zagrijavanjem otopine (Veggi i sur., 2013). Zagrijavanjem otapala za ekstrakciju i prirodno prisutne vode u stanicama materijala dolazi do povećanja pritiska na staničnu stijenku stanica i njenog puknuća. Puknuće stanične stijenke dovodi do prodiranja otapala unutar stanice i difuzije sekundarnih metabolita u otapalo i time se postiže ekstrakcija sekundarnih biljnih metabolita.

Na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima značajno utječu: vrsta otapala, temperatura, snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije te veličina čestica.

***Vrsta otapala*** **-** otapala sa višom dielektričnom konstantom mogu apsorbirati više mikrovalne energije, pa je zato bitna polarnost otapala kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Istraživanja su pokazala da se upotrebom polarnih otapala postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih i drugih spojeva (Wang i Weller, 2006). Kod polarnih otapala male molekularne mase i visoke dielektrične konstante, kao što su voda, metanol, etanol, aceton i formamid pod utjecajem zračenja mikrovalovima, vrlo brzo dolazi do povećanja temperature. Omjer količine otapala i materijala je također jedan od bitnih faktora. Upotreba velike količine otapala dovodi do slabijeg zagrijavanja materijala što dovodi do većih troškova jer je potrebno povećati snagu mikrovalova. Idealan volumen otapala je onaj volumen koji prekrije uzorak koji se ekstrahira (Mandal i sur., 2007).

***Vrijeme ekstrakcije*** je bitan parametar pri ekstrakciji jer što je duže vrijeme ekstrakcije, količina ekstrahiranog analita raste uz povećanje vjerojatnosti degradacije zbog prisustva termolabilnih komponenata. Previsoka temperatura i predugo trajanje ekstrakcije dovode do gubitka otapala i povećavaju mogućnost oksidacije bioaktivnih spojeva. Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima vrijeme je najčešće između nekoliko minuta do maksimalno pola sata (Ballard i sur., 2010). Dahmoune i sur. (2015) su dokazali na suhim listovima *Myrtus communis* da se ukupni fenolni sastav povećao s produljenim vremenom MAE koristeći početnu snagu valova od 500 W s maksimumom od 159 mg GAE/g u 60 s, te je nakon 90 s opadao.

Povećanjem ***temperature*** dolazi do ubrzanja difuzije otapala u unutrašnjost uzorka što rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. No, ukoliko se ekstrahiraju termolabilne komponente tada visoke temperature mogu dovesti do degradacije bioaktivnih spojeva (Li i sur., 2010).

***Snaga mikrovalova*** zajedno s trajanjem ekstrakcije su dva usko povezana čimbenika koja koriste dva pristupa: kombinaciju niske ili umjerene snage mikrovalova uz dulje trajanje ekstrakcije ili visoku snagu uz kratko trajanje ekstrakcije. Izabrana snaga mikrovalova tijekom MAE mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature, što dovodi do razgradnje termolabilnih supstanci (Font i sur., 1998). Dahmoune i sur. (2015) su istraživali utjecaj MAE na ukupni fenolni sastav suhih listova *Myrtus communis* koristeći snagu valova od 300 do 900W s 40% tnim etanolom, zračenjem od 2 min i omjerom tekućina:otapalo 20:1 (mL/g). Dokazali su značajno povećanje ukupnih fenolnih kiselina od 134,63 do 152,25 mg GAE/g koristeći snagu valova od 400 do 500 W, dok se koncentracija istih smanjila povišenjem snage valova iznad 600 W (129,95 mg GAE/g) najvjerojatnije zbog termalne degradacije BAM-a. Također, Dahmoune i sur. (2015) su u svojem istraživanju optimizirali ekstrakciju bioaktivnih molekula iz lista tršlje s područja Alžira pomoću MAE, te optimiziranu MAE usporedili s konvencionalom metodom ekstrakcije i UAE. Optimalni uvjeti za izolaciju BAM pomoću MAE su se pokazali kao 46 % vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije od 60 s, omjer tekućine i krutine 28:1 i snagom mikrovalova od 17,86 W/mL, a dobiveno iskorištenje je bilo u iznosu od 185,69 ± 18,35 mg GAE/g st. Nakon usporedbe s konvencionalnom metodom ekstrakcije i UAE, optimizirana MAE je dala najveća iskorištenja ukupnih fenola, flavonoida i tanina.

Na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima utječe i ***veličina čestica*** koja bi trebala biti od 100 µm do 2 mm. Presitne čestice nisu poželjne jer mogu izazvati tehničke probleme i potrebu za kasnijim pročišćavanjem ekstrakta.

Iz svega navedenog, zaključuje se da na učinkovitost MAE značajno utječu različiti parametri te je na početku ekstrakcije izuzetno bitno poznavati karakteristike uzorka i adekvatno napraviti pripremu istoga.

# *3. MATERIJALI I METODE*

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju korišteni su osušeni i samljeveni uzorci lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.), ručno ubrani na 4 lokacije: Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka u tri termina tijekom vegetacije 2019. godine: svibanj (1. fenološka faza – *faza cvjetanja*), kolovoz (2. fenološka faza – *faza ranog ploda*), listopad (3. fenološka faza – *faza zrelog ploda*). Podatci o lokacijama i njihovim bioklimatskim karakteristikama dati su u *Tablici 4*. Nakon branja uzorci su prebačeni u tamnu prostoriju gdje su ostavljeni na sušenju pri sobnoj temperaturi, nakon čega su očišćeni. Očišćeni uzorci su samljeveni (Nutribullet, Capital Brands LLC, Los Angeles, SAD), spremljeni u plastične spremnike te stavljeni na skladištenje u hladnjak na + 4 °C do provođenja daljnjih analiza.

***Tablica 4.*** Geografski i bioklimatski podaci lokacija uzorkovanja

| Lokacija | Nadmorska visina (m) | Geografska širina | Geografska dužina | Fenološka faza | Prosječna T (°C) | Prosječna insolacija (h) | Prosječne oborine (mm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BARBARIGA** | 4 | 44° 59' 27" N | 13° 44' 12" E | 1 | 17,2 | 311,7 | 84,2 |
| | | | | 2 | 24,6 | 352,9 | 51,5 |
| | | | | 3 | 14,4 | 174,4 | 27,7 |
| **LUN** | 15 | 44° 40' 59" N | 14° 45' 15" E | 1 | 18,9 | 306,7 | 48,7 |
| | | | | 2 | 26,9 | 358,2 | 7,00 |
| | | | | 3 | 16,1 | 199,9 | 40,5 |
| **HVAR** | 330 | 43° 7' 51" N | 16° 56' 34" E | 1 | 19,7 | 318,1 | 33,3 |
| | | | | 2 | 27,8 | 368,4 | 0,00 |
| | | | | 3 | 17,5 | 243,1 | 25,3 |
| **VELA LUKA** | 45 | 42° 57' 40" N | 16° 43' 17" E | 1 | 18,7 | 289,4 | 19,3 |
| | | | | 2 | 26,4 | 384,4 | 0,00 |
| | | | | 3 | 15,2 | 230,2 | 27,8 |

### 3.1.2. Kemikalije i standardi

Sve uporabljene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

- ***Kemikalije za postupak ekstrakcije***
  - 80 %-tna vodena otopina etanola (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
  - 80 %-tna vodena otopina metanola (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

- Destilirana voda

➢ ***Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje***

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 80 %-tni
- Metanol, 100 %-tni, (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol 80 %-tni
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid ($Na_2CO_3$) (Lach-Ner, Neratovice Češka)
- Galna kiselina, $C_7H_6O_5$, Mr=170,12 g/mol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Aluminijev klorid, $AlCl_3 \times 6H_2O$, Mr=241,45 g/mol (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev acetat, $CH_3CO_2K$, Mr=98,15 g/mol (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Kvercetin, $C_{15}H_{10}O_7$, Mr=302,23 g/mol (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 % HCl, Mr=36,46 g/mol (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- Kafeinska kiselina, $C_9H_8O_4$, Mr=180,16 g/mol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

➢ ***Kemikalije i standardi za HPLC određivanje***

- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ, Millipore, SAD
- Mravlja kiselina (Prolabo, Velika Britanija)
- Acetonitril HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)
- Metanol HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)

➢ ***Standardi:***

| **Flavanoli:** | **Fenolne kiseline:** | **Flavonol glikozidi:** |
|---|---|---|
| Katehin, $C_{15}H_{14}O_6$, Mr=290,26 g/mol, (Extrasynthese, Francuska) | Galna kiselina, $C_7H_6O_5$, Mr=170,12 g/mol (Sigma, Njemačka) | Kvercetin–3-*β*-D-glukozid, $C_{21}H_{20}O_{12}$, Mr=464,38 g/mol, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) |
| Epikatehin, $C_{15}H_{14}O_6$, Mr=290,26 g/mol, (Extrasynthese, Francuska) | Kafeinska kiselina, Mr=180,16 g/mol, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) | Kamferol 3-*O*-rutinozid, $C_{27}H_{30}O_{15}$, Mr=594,53 g/mol, Extrasynthese, Francuska |

| | |
|---|---|
| Epikatehin galat, $C_{22}H18O_{10}$, Mr=442,37 g/mol, (Extrasynthese, Francuska) | *p*-kumarinska kiselina, $C_9H_{18}O_9$, Mr=164,16 g/mol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) |
| Epigalokatehin galat, $C_{22}H_{18}O_{11}$, Mr=458,37 g/mol, (Extrasynthese, Francuska) | Ferulinska kiselina, $C_{10}H_{10}O_4$, Mr=194,2 g/mol, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) |
| Reservatrol, $C_{14}H_{12}O_3$, Mr=228,24 g/mol, (Extrasynthese Francuska) | Klorogenska kiselina, $C_{16}H_{18}O_9$, Mr=354,38 g/mol, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) |
| | Neoklorogenska kiselina, $C_{16}H_{18}O_9$, Mr=354,38 g/mol, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) |

- ***Kemikalije i standardi za GC-MS određivanje***
  - heksan (Gram-mol, Hrvatska)
  - standardna smjesa $C_8$ – $C_{20}$ alkana (Sigma-Aldrich Co., SAD)

- ***Mikroorganizmi za određivanje antimikrobnog učinka eteričnog ulja***
  - *Escherichia coli* soj AB1157 (Institut "Ruđer Bošković", laboratorijska kolekcija)
  - *Erwinia amylovora* soj EaED (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, kolekcija Zavoda za fitopatologiju)

- ***Kemikalije i hranjive podloge za disk difuzijsku metodu***
  - kloramfenikol (Merck, Njemačka)
  - hranjivi agar (NA, eng. “nutrient agar”, Rudolph i sur., 1990.)
  - tekući hranjivi bujon (NB, engl. “nutrient broth)
  - tekući hranjivi medij LB (Luria-Bertani) (Miller, 1992.)
  - kruta hranjiva LB-podloga

### 3.1.3. Oprema

- Analitička vaga (Mettler AJ100, Mettler, Švicarska), (točnost ±0,01g)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Magnetska miješalica (IKAMAG, IKA, Njemačka)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis)
- Destilacijsko postrojenje (Darkol, Hrvatska)
- Freza (Darkol, Hrvatska)
- Spektrofotometar (Helios Delta Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija)
- Tekućinski kromatograf Agilent 1260 sistem (HPLC, Agilent, Santa Clara, CA, USA) opremljen sa:
  - 1260 kvarternom pumpom,
  - 1260 autosamplerom,
  - 1260 termostatiranom kolonom,
  - 1260 DAD VL+ detektorom
  - software „OpenLAB ChemStation Workstation“
- Tekućinski kromatograf Agilent 1290 sistem (UPLC, Agilent, Santa Clara, CA, USA) opremljen sa:
  - 1290 binarnom pumpom,
  - 1290 autosamplerom,
  - 1290 termostatirane kolone,
  - Agilent 6430 trostrukim kvadropol MS/MS detektora
  - software „MassHunter Workstation for QQQ“,
- Plinski kromatograf s masenom spektrometrijom QP 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Statistički program Statistica 10.0., (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje konvencionalnom ekstrakcijom

Provedeno je optimiranje postupka konvencionalne tehnike ekstrakcije pri čemu su varirani vrsta otapala (voda, etanol, metalol, 80 % vodene otopine etanola i metanola) i vrijeme ekstrakcije (od 30, 60, 90, 120, 150, 180 te 210 minuta ). U plastičnu epruvetu (Falcon) odvaže se 0,2 g fino

samljevenog uzorka lista tršlje s točnošću ± 0,001 g te se uzorak homogenizira dodavanjem 20 mL otapala neposredno prije ekstrakcije. Postupak ekstrakcije se provodi kontinuiranim miješanjem (Vortex, Ika, Njemačka) pri sobnoj temperaturi kroz navedena vremena. Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakt se filtrira preko filter papira Whatman br 40 (Whatman International Ltd., Velika Britanija) prelije u spremnik i čuva na +4 ˚C do trenutka provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.2. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija fenola iz uzorka lista tršlje provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) u mikrovalnom reaktoru (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis). Plan eksperimenata za optimiranje uvjeta ekstrakcije BAM-a izrađen je centralnom kompozitnom dizajnu u programskom paketu Statistica 10.0 (StatSoft, SAD). Ispitan je utjecaj temperature (50 – 70 °C), snage (200-500 W), vremena ekstrakcije (4-12 min) te otapala za ekstrakciju (80 %-tne vodene otopine etanola i metanola) (*Tablica 5*).

***Tablica 5.*** Plan pokusa ekstrakcije ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavanoida primjenom mikrovalova

| Uzorak | Temperatura (°C) | Snaga (W) | Vrijeme (min) |
|---|---|---|---|
| **1** | 50 | 200 | 4 |
| **2** | 50 | 200 | 12 |
| **3** | 50 | 500 | 4 |
| **4** | 50 | 500 | 12 |
| **5** | 70 | 200 | 4 |
| **6** | 70 | 200 | 12 |
| **7** | 70 | 500 | 4 |
| **8** | 70 | 500 | 12 |
| **9** | 43 | 350 | 8 |
| **10** | 77 | 350 | 8 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **11** | 60 | 98 | 8 |
| **12** | 60 | 602 | 8 |
| **13** | 60 | 350 | 1 |
| **14** | 60 | 350 | 15 |
| **15 (K)** | 60 | 350 | 8 |
| **16 (K)** | 60 | 350 | 8 |

- *Priprema ekstrakata:*

0,5 g samljevenog uzorka (*Pistacia lentiscus* L.) izvaganog s točnošću ± 0,0001 g homogenizira se s 20 mL otapala za ekstrakciju (80 %-tne vodene otopine metanola i etanola) u tikvici sa šlifom okruglog dna volumena 50 mL. Tikvica sa uzorkom u koju se ubaci magnetski mješač se postavi na predviđen prostor na postolju u mikrovalnom reaktoru. Na mikrovalnom reaktoru se postave opći parametri ekstrakcije: miješanje 50 %, vrijeme za postizanje temperature 2 min, ventilacija 1 min, te zadani parametri po planu pokusa prikazani u tablici 5. Nakon ekstrakcije uzorci se kvantitativno prebace u odmjerne tikvice od 25 mL koje se nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem se zatim odekantira od nastaloga taloga (te profiltrira ukoliko je to potrebno) u čiste falkonice od 50 mL. Ekstrakti se čuvaju na temperaturi od -18 °C do trenutka provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- *Princip određivanja:*

Za određivanje ukupnih fenola u etanolnom ili metanolnom ekstraktu uzorka primjenjuju se spektrofotometrijske metode, a najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforvolframove i fosfomolbidenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volfram oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Metodom se mjeri nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji fenola. Ekstrakt svakog uzorka pripremljen je u tri paralele (Cicco N. i Lattanzio V., 2011).

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 + Fenol \rightarrow (fenol\text{-}MoW_{11}O_{40})^{4-}$$

$$Mo(VI)\ (žuto\ obojen) + e^- \rightarrow Mo(V)\ (plavo\ obojen)$$

- *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

- *Izrada baždarnog pravca:*

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola ili metanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 20, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Apsorbancija svakog pripremljenog razrjeđenja određuje se kao što je opisano u postupku određivanja za ukupne fenole.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel 2016® pri čemu su na apscisi nanesene masene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (*Tablica 6*).

***Tablica 6.*** Jednadžbe baždarnih pravaca za galnu kiselinu

| **Standard galne kiseline** | **Jednadžba baždarnog pravca** | **Koeficijent determinacije, $R^2$** |
|---|---|---|
| **80 % metanol** | y= 0,0041x + 0,0075 | 0,999 |
| **80 % etanol** | y= 0,0039x + 0,0106 | 0,995 |

Količina ukupnih fenola u etanolnim i metanolnim ekstraktima izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca za galnu kiselinu, a maseni udio ukupnih fenola u listovima tršlje izraženi su kao

miligrami ekvivalenta galne kiseline na 100 grama suhog lista tršlje (mg GAE/100 g). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost tri paralelnih određivanja ± SD.

### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

- *Princip određivanja:*

Određivanje flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom (Chang i sur., 2002) koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenje pri 415 nm. Ekstrakt svakog uzorka izrađen je u tri paralele.

- *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL odgovarajućeg otapala, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Maseni udjeli ukupnih flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg/100 g lista tršlje.

- *Izrada baždarnog pravca kvercetina:*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvercetina, masene koncentracije 100 mg/L. Od standardne otopine kvercetina rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose 20, 40, 60, 80, 120, 160, 200 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL odgovarajućeg otapala , 0,1 ml 10 %-tnog aluminijevog klorida , 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti se način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapala te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 415 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg /L).

Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (*Tablica 7*).

***Tablica 7.*** Jednadžbe baždarnih pravaca za kvercetin

| Standard kvercetina | Jednadžba baždarnog pravca | Koeficijent determinacije, $R^2$ |
|---|---|---|
| **80 % metanol** | y= 0,0026x + 0,0191 | 0,998 |
| **80 % etanol** | y= 0,0023x + 0,0212 | 0,995 |

### 3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

- *Princip određivanja*

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina falvonola temelji se na reakciji kiselinske hidrolize popraćene razvojem ružičasto-crvenkastog obojenja čiji se intenzitet određuje mjerenjem aprobancije na 320 nm za hidroksicimetne kiseline dok se flavonoli određuju pri 360 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina i flavonola izravno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Howard i sur., 2003). Ekstrakt svakog uzorka izrađen je u tri paralele.

- *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta tršlje (prethodno razrijeđen), 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu ili metanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola, apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izražavaju se kao ekvivalent kafeinske kiseline (mg/100 g lista tršlje). Maseni udjeli flavonola izražavaju se kao ekvivalent kvercetina (mg/100 g lista tršlje).

- *Izrada baždarnih pravaca kafeinske kiseline i kvercetina*

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kafeinske kiseline ili kvercetina, masene koncentracije 100 mg/L. Od te standardne otopine kafeinske kiseline ili kvercetna rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline ili kvercetina iznose 2, 5, 7, 10, 25, 50, 66,7 mg/L. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu ili metanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 320 nm o masenoj koncentraciji kafeinske kiseline (mg $L^{-1}$) i pri 360 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg$L^{-1}$ ).

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (*Tablica 8*).

***Tablica 8.*** Jednadžbe baždarnih pravaca za kafeinsku kiselinu i kvercetin

| | **Standard kafeinske kiseline** | | **Standard kvercetina** | |
|---|---|---|---|---|
| | **Jednadžba baždarnog pravca** | **Koeficijent determinacije, $R^2$** | **Jednadžba baždarnog pravca** | **Koeficijent determinacije, $R^2$** |
| **80 % metanol** | y= 0,0047x + 0,0122 | 0,992 | y= 0,0032x + 0,0128 | 0,993 |
| **80 % etanol** | y= 0,0041x + 0,0017 | 0,989 | y= 0,0039x + 0,014 | 0,999 |

### 3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju

- *Princip određivanja:*

Određivanje sastava i udjela pojedinačnih fenolnih kiselina i flavonoida, provedeno je primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) metodom koju su opisati Fecka i Turek (2008), uz određene modifikacije. Modifikacija navedene metode provedena je u dijelu kromatografske analize gdje je kao mobilna faza upotrijebljena 3 %-tna mravlja kiselina umjesto 0,2 %, 1,5 % i 5 %-tne mravlje kiseline.

Metoda za određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC-a se temelji na ekstrakciji fenolnih spojeva primjenom otapala različite polarnosti s ciljem povećanja ekstrakcijskog kapaciteta te razdvajanjem i elucijom fenolnih spojeva na kromatografskoj koloni u nizu padajuće polarnosti. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na Agilent 1260 Infinity HPLC sustavu.

Određivanje je provedeno pri slijedećim kromatografskim uvjetima:

| | |
|---|---|
| Kolona: | Luna 100-5C18, 5µm 250 × 4,6 mm I.D. (Phenomenex) |
| Mobilne faze: | Otapalo A-3 %-tna mravlja kiselina u acetonitrilu (v/v) |
| | Otapalo B-3 %-tna mravlja kiselina u vodi (v/v) |
| Eluiranje: | Gradijentno; prikazan u *Tablici 9* |
| Detektor: | UV-Photo Diode Array (valna duljina=278 nm za identifikaciju fenolnih kiselina i 340 do 360 nm za identifikaciju flavonoida) |
| Temperatura: | sobna |
| Vrijeme trajanja: | 35 minuta |
| Injektirani volumen: | 20 mL |

Ekvilibracija: 2 minute

***Tablica 9.*** Gradijent za HPLC analizu fenolnih spojeva

| t (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) | Protok (mL/min) |
|---|---|---|---|
| **0** | 10 | 90 | 0,9 |
| **25** | 40 | 60 | 0,9 |
| **30** | 70 | 30 | 0,9 |
| **35** | 10 | 90 | 0,9 |

- *Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva*

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 380 nm. Flavonol glikozidi identificirani su na 340 nm, a fenolne kiseline na 278 nm.

***Tablica 10.*** Jednadžba baždarnih pravaca za pojedine fenolne spojeve

| Naziv standarda | Jednadžba baždarnog pravca | Koeficijent determinacije ($R^2$) |
|---|---|---|
| Kvercetin 3-*β*-D-glukozid | Y = 37,386 X | 1,0000 |
| Kamferol 3-*O*-rutinozid | Y = 41,313 X | 1,0000 |
| Klorogenska kiselina | Y = 63,539 X | 0,9874 |
| *p*-kumarinska kiselina | Y = 135,81 X | 1,0000 |
| Ferulinska kiselina | Y = 19,291 X | 0,9958 |
| Kafeinska kiselina | Y = 68,301 X | 0,9998 |
| Katehin | Y = 12,037 X | 0,9949 |
| Procijandin B1 | Y = 3,5700 X | 0,9952 |

### 3.2.7. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju

- *Princip određivanja:*

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju – metoda vanjskog standarda temelji se na gradijentnoj eluciji pri čemu se ekstrahirani fenolni spojevi eluiraju u nizu padajuće polarnosti.

UPLC uz MS/MS je provedena prema metodi koju su prethodno opisali Serra i sur., (2011), uz određene modifikacije prikazane u tablici 11 i kromatografskim uvjetima.

U ovoj analizi korištene su mobilne faze: A (0,1 % mravlja kiselina u $H_2O$) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu).

- *Postupak određivanja*:

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na tekućinskom kromatografu Agilent 1290 sistemom. Određivanje je provedeno pri slijedećim kromatografskim uvjetima:

| | |
|---|---|
| Kolona | Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (100 × 2,1 mm I.D.) |
| Pokretna faza | Otapalo A: 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi |
| | Otapalo B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu |
| Detektor | MS/MS trostruki kvadropol (QqQ) |
| Ionski izvor | ESI |
| MS parametri | Temperatura plina: 300 °C |
| Protok plina (N2) | 11 L/h |
| Nebulizer | 40 psi |
| Pozitivni/negativni napon na kapilari | +4000 V / -3500 V |
| Maseni detektor | dMRM mode (m/z od 100 do 1000) |
| Eluiranje | gradijentno (gradijent prikazan u *Tablici 11*) |
| Temperatura | 35 °C |
| Vrijeme trajanja | 12,5 min |

***Tablica 11.*** Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (Serra i sur., 2011)

| t (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) | Protok (mL/min) |
|---|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 | 0,4 |
| 10 | 65 | 35 | 0,4 |
| 10,1 | 20 | 80 | 0,4 |
| 11 | 20 | 80 | 0,4 |
| 11,1 | 95 | 5 | 0,4 |
| 12,5 | 95 | 5 | 0,4 |

- *Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva:*

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja prikazanih u tablici 12. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih prekursor i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija je provedena na sljedeći način: 3-*O*-feruloilkina kiselina kvantificirana je prema standardu ferulinske kiseline, 4-*p*-kumaroilkina kiselina i 3-*p*-kumaroilkina kiselina *p*-kumarinskom kiselinom, 3-*O*-kafeoilkina kiselina prema standardu klorogenske kiseline, monogaloil glukoza, 5-*O*-galoilkina kiselina, digaloilkina kiselina te trigaloilkina kiselina kvantificirane su prema standardnoj krivulji galne kiseline, miricetin rutinozid, miricetin glukuronid i miricetin ramnozid prema standardu miricetina, kamferol-3-glukozid, kamferol-ramnozil-heksozid, kamferol-pentozil-heksozid, kamferol-pentozid, kamferol-ramnozid, kamferol-acetil-rutinozid kvantificirani su prema standardu kamferol-3-rutinozida, a kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid i kvercetin-3-rutinozid prema standardu kvercetin-3-glukozida. Dobivene koncentracije izražene su kao mg/100 g uzorka.

***Tablica 12***. Jednadžba baždarnih pravaca za pojedine fenolne spojeve

| Naziv standarda | Jednadžba baždarnog pravca | Koeficijent determinacije ($R^2$) |
|---|---|---|
| Kvercetin-3-glukozid | Y=3224,50X | 0,9474 |
| Kamferol-3-rutinozid | Y=3452X | 0,9237 |
| Kafeinska kiselina | Y=973,30X | 0,8574 |
| Epikatehin | Y=2776,20X | 0,8869 |
| Ferulinska kiselina | Y=368,81X | 0,8827 |
| Galna kiselina | Y=480,65X | 0,8581 |
| Klorogenska kiselina | Y=2056,20X | 0,9399 |
| *p*-kumarinska kiselina | Y=994,29X | 0,9375 |
| Katehin | Y=2935,30X | 0,9741 |
| Epigalokatehin galat | Y=2873,10X | 0,9711 |
| Rutin | Y=1477,80X | 0,9092 |
| Epikatehin galat | Y=1101,60X | 0,8700 |
| Procijanidin B1 | Y=55,58X | 0,9926 |
| Procijanidin B2 | Y=69,97X | 0,9952 |
| Miricetin | Y=212,42X | 0,9962 |
| Apigenin | Y=1684,50X | 0,9603 |
| Luteolin | Y=1292,90X | 0,9550 |



***Slika 14.*** Uređaji za ultradjelotvornu tekućinsku kromatografiju (UPLC) uz MS/MS detekciju i visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju (HPLC) uz UV/VIS PDA detekciju (vlastita fotografija)

### 3.2.8. Dobivanje eteričnog ulja iz listova postupkom parne destilacije

Pripremljeni biljni materijal tršlje (20 kg) se stavi u destilacijski kotao u rastresitom stanju, tako da biljka ne bude previše zbijena kako bi se omogućio nesmetani protok pare. Svaka destilacija uzorka se provodi 3 puta pri konstantnoj temperaturi (100 °C) i vremenu od 90 min, uz variranje tlaka pare i to 0,3, 0,7 i 1 bara.

### 3.2.9. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih sastavnica eteričnog ulja tršlje primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS)

Identifikacija i određivanje kvantitativnog udjela sastavnica u uzorcima eteričnog ulja lista tršlje provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom na plinskom kromatografu QP 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) masenim spektrometrom (MS) (*Slika 15*). Određivanje pojedinačnih sastavnica u uzorcima provedeno je metodom koju je opisalo Sparkamn (2005) uz određene modifikacije. Određivanje je provedeno pri slijedećim kromatografskim uvjetima:

| | |
|---|---|
| Kolona | ZB-5 MS 60m x 0,32 mm x µm- Phenomenex, Torrance, USA |
| Plin nosioc | Helij |
| Protok | 2,2 mL/min |
| Temperatura injektora | 250 °C |
| Radno područje | split (1:50) |
| Temepratura detektora | 250 °C |
| Temperatura prijelazne linije | 280 °C |
| Temperaturni program | 60 °C, 1 min<br>60-250 °C, 4 °C/min |
| Volumen injektiranog uzorka | 1 µL (razrijeđen u heksanu 1:100) |

Energija elektrona za ionizaciju molekula uzoraka bila je 70 eV. Parametri masenog spektrometra postavljeni su na brzinu očitanja 1 očitanje/s (scan/s), a opseg razdvajanja mase i naboja (m/z) u rasponu 43 – 350. Kako bi se izračunao retencijski indeks izdvojenih aromatičnih spojeva pripremljena je standardna smjesa $C_8$ – $C_{20}$ alkana (Sigma-Aldrich Co., SAD) i analizirana pod istim kromatografskim uvjetima kao i uzorci.

- *Identifikacija aromatičnih spojeva*

Identifikacija aromatičnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara izdvojenih aromatičnih spojeva s onima u bazi podataka NIST, ver. 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, SAD) i pomoću računalnog programa AMDIS, ver. 2.62 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) (NIST, Gaithersburg, MD, SAD) te usporedbom dobivenih retencijskih indeksa s vrijednostima u literaturi (Adams, 2001, interna knjižnica). Kvantitativni udio izdvojenih aromatičnih spojeva izražen je kao udio površine u ukupnoj aromi uzorka.



***Slika 15.*** Uređaj za plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (GC-MS) QP 2010 Plus (vlastita fotografija)

### 3.2.10. Metoda određivanja antimikrobnog učinka eteričnog ulja tršlje primjenom disk-difuzijske metode

- *Priprema tekućih hranjivih medija NB i LB*

Hranjivi mediji prirede se otapanjem sastojaka u destiliranoj vodi uz zagrijavanje na magnetskoj miješalici sukladno preporukama proizvođača. Otopljene hranjive podloge steriliziraju se autoklaviranjem na 121 °C u trajanju od 15 minuta.

- *Priprema krutih hranjivih podloga NA i LB*

Krute hranjive podloge NA i LB pripreme se prema uputama proizvođača, potom se steriliziraju autoklaviranjem na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon sterilizacije otopina hranjivog medija NA i LB, prenesene se u kabinet za rad u sterilnim uvjetima i ostavljene da se ohlade na oko 50 °C. Poluotvorene petrijevke se ostave 10 minuta u cirkulaciji sterilnog zraka radi skrutnjavanja agara i prosušivanja njegove površine. Nakon toga su se petrijevke zatvaraju, njihovi

poklopci se označavaju oznakama hranjive podloge i datumom pripreme i na taj način su spremne za provedbu eksperimenta.

- *Priprema kultura mikroorganizama*

Čista bakterijska kultura *Erwinia amylovora* soj EaED uzgaja se u staklenoj Erlenmeyerovoj tikvici od 200 ml u tekućem hranjivom mediju NB pri 28 ºC tijekom 24 sata, dok se čista bakterijska kultura *Escherichia coli* soj AB1157 uzgaja u staklenoj Erlenmeyerovoj tikvici od 200 ml u tekućem hranjivom mediju LB pri temepraturi od 37 ºC tijekom 24 sata.

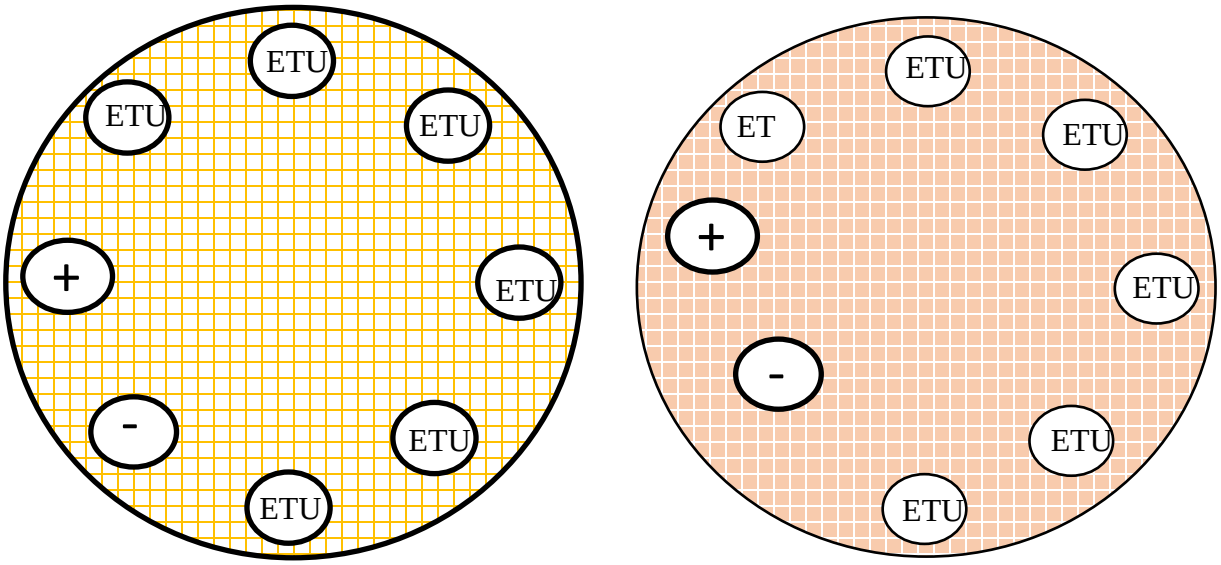
- *Disk-difuzijska metoda*

Određivanje antimikrobnog učinka eteričnog ulja tršlje rađeno je prema metodi koju su prethodno opisali Bauer i sur., (1966). Krute hranjive podloge NA i LB se izliju u staklene petrijevke (ϕ 9 cm) unutar kabineta za rad u sterilnim uvjetima. Po 50 μL tekuće kulture bakterije *E. amylovora* soj EaED se inokulira na prosušenu krutu hranjivu podlogu NA te 100 μL tekuće kulture bakterije *E. coli* soj AB1157 se inokulira na prosušenu krutu hranjivu podlogu NB. Bakterijske kulture se po površini agara ravnomjerno razmazuju pomoću sterilnog staklenog štapića.

Na krutim medijima NA i LB nakon hlađenja i izlaska vodene pare iz petrijevki, sterilnom pincetom, se postavljaju čisti sterilni papirnati filter-diskovi promjera 6 mm (Bio-rad, SAD) i to tako da se na svaku od petrijevki u pokusu postavlja po osam diskova (*Slika 16*). Na njih se kasnije aplicira eterično ulje tršlje različitih berbi i lokacija, te kontrola. Eksperiment se provodi u tri ponavljanja.

Svako od ukupno dvanaest eteričnih ulja tršlje se aplicirala na zaseban čisti filter - disk u volumenu od 5 μL, jednako kao i kod pozitivne kontrole antibiotika kloramfenikola u volumenu od 1μL i negativne kontrole destilirane vode.

Petrijeve zdjelice se zatim stavljaju na inkubaciju u termostat pri temperaturi od 37 °C, a nakon završenog vremena inkubacije mjere se zone inhibicije (mm).




***Slika 16.*** Prikaz rasporeda diskova od filter papira na podlozi u Petrijevoj zdjelici, natopljenih različitim volumenima istraživanih agensa

Bakterijska noćna kultura *E. amylovora* soj EaED nacijepljena na NA krutu podlogu

Bakterijska noćna kultura *E. coli* soj AB1157 nacijepljena na LB krutu podlogu

ETU - Eterično ulje tršlje (*P. lentiscus* L.) različitih uzoraka

\+ Pozitivna kontrola; antibiotik kloramfenikol

\- Negativna kontrola; sterilna destilirana voda

### 3.2.11. Statistička analiza

Plan eksperimenata za optimiranje uvjeta ekstrakcije potpomognutog mikrovalovima bioaktivnih molekula iz lista tršlje korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine u programskom paketu Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD)

Centralno-kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od tri dijela: puni $2^k$ faktorijalni dizajn (dizajn prvog reda), osni dio sastavljen od 2k broja točaka smještenih tako da su dvije točke položene na osima kontrolnih varijabli na istoj udaljenosti α od centra te od centralne točke i replikacije u istoj (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

Prema CCD-u određene su granice ispitivanih parametara na slijedeći način: temperatura od 50 do 70 °C, snaga mikrovalova od 200 do 500 W te vrijeme ekstrakcije od 4 do 12 min. Svaki od tri ispitivana parametra promatran je na tri razine, nižoj (-1), središnjoj (0) i višoj (1) što je

ukupno 16 pokusa uključujući faktorske, aksijalne i centralnu točku sa tri ponavljanja (*Tablica 5*) i to za dva otapala – 80 % -tni metanol i 80 % -tni etanol. Kao ovisne varijable određeni su maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g uzorka), flavonoida, flavonola (mg QE/g uzorka) i hidroksicimetnih kiselina (mg KAF/ g uzorka).

Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Metoda odzivne površine analizira odnose između nekoliko ulaznih varijabli te jedne ili više varijabli odziva. Osnovni motiv za korištenje RSM metode je pronalaženje optimalnih uvjeta za dobivanje optimalnog odziva. Regresijski model za svaku promatranu ovisnu varijablu izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=j}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \quad [1]$$

gdje je:

Y- predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

$\beta_0$ - fiksni koeficijent a βi, βii i βij linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

Xi...Xj - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable

Prilikom optimizacije parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima postavljena je visoka preferencija (1,0) za ovisnu varijablu, odnosno koncentraciju ukupnih fenola. Ulazni parametri su promatrani u različitom broju koraka ovisno o njihovom rasponu, a radi preciznije optimizacije. Tako je temperatura promatrana u 20, snaga mikrovalova u 100, a vrijeme u 8 koraka.

Utjecaj ulaznih varijabli u konvencionalnoj ekstrakciji (vrijeme ekstrakcije i ekstrakcijsko otapalo) na masene udjele fenolnih spojeva ispitano je provođenjem jednofaktorskom analizom varijance (engl. *one-way ANOVA*) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey HSD testom.

Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli (lokacija, fenološka faza biljke i ekstrakcijsko otapalo) na izlazne varijable (maseni udjeli BAM-a u ekstraktima i eteričnim uljima) te postojanje razlike među provedenim uvjetima ekstrakcije korištena je analiza varijance (ANOVA). Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

# *4. REZULTATI I RASPRAVA*

Tršlja je zimzelena biljka koja u Hrvatskoj raste duž Jadranske obale, a čiji nadzemni dijelovi (lišće i stapka) sadrže velik broj različitih fenolnih spojeva (Arab i sur., 2014; Rodriguez -Perez i sur. 2013). S obzirom na fenolni sastav i visoki biološki potencijal listova tršlje (Zitouni i sur., 2016) potrebno je odrediti učinkovitu metodu ekstrakcije i definirati optimalne parametre kako bi se osigurala minimalna degradacija i ostvario veći prinos fenolnih spojeva uz što manju upotrebu organskih otapala, nižu temperaturu i kraće vrijeme ekstrakcije.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti (BAM) iz biljnih vrsta najčešće se provodi polarnim otapalima, a najprikladnija otapala su mješavina vodenih otopina etanola, metanola, acetona i etil acetata (Bromberger Soquetta i sur., 2018). Nedostaci konvencionalnih metoda (CE) su korištenje visoke temperature, kompleksni procesi, vremenski su zahtjevne, velika potrošnja organskih otapala, te kontaminacija i gubitak analita (Rosello-Soto i sur., 2015). Za razliku od CE, metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) (Ruesgas- Ramoyn i sur., 2017), visokim tlakom (HPAE) (Huang i sur., 2013), ultrazvukom (UAE) (Chanioti i Tzia, 2018) i ekstrakcija otapalima pri povišenom tlakom (ASE) (Dragović-Uzelac i sur., 2012) prema dosadašnjim istraživanjima pokazale su određene prednosti u usporedbi s konvencionalnim tehnikama.

U prvom djelu istraživanja cilj je bio odrediti optimalne uvjete izolacije fenolnih spojeva iz lista tršlje primjenom različitih postupaka ekstrakcije (CE i MAE) koristeći različite vrste otapala (80 % metanol i etanol) i vrijeme ekstrakcije. Analize su provedene na listovima tršlje ubranim na lokacijama Barbariga, Pag, Hvar i Vela Luka u tri termina tijekom vegetacije 2019. godine: svibanj (1. fenološka faza – faza cvjetanja), kolovoz (2. fenološka faza – faza ranog ploda), listopad (3. fenološka faza – faza zrelog ploda).

Nakon provedenih ekstrakcija u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, flavonoli i hidroksicimetne kiseline), te su na temelju dobivenih rezultata određeni optimalni uvjeti za svaki postupak ekstrakcije. Primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV Photo Diode Array (PDA) detekciju i spregnutog sustatava tekućinske kromatografije s masenom spektroskopijom (LC-MS/MS) u dobivenim ekstraktima su određeni pojedinačni fenolni spojevi.

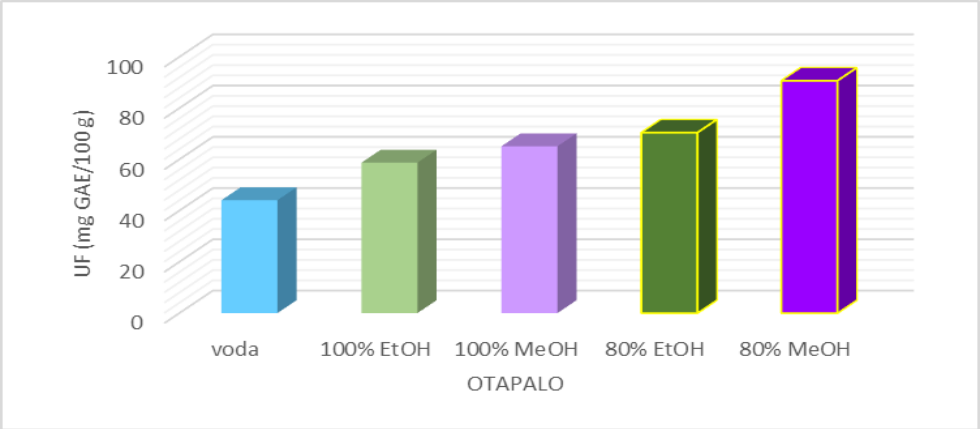
Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli na promatrane parametre ekstrakcija.

U drugom dijelu istraživanja iz uzoraka listova tršlje provedena je izolacija eteričnih ulja pomoću parne destilacije pri čemu je praćen utjecaj tlaka (0,3, 0,7 i 1 bara) na prinose eteričnog ulja s ciljem postizanja maksimalnog prinosa. Identifikacija i kvantifikacija glavnih sastavnica eteričnog ulja određene su primjenom spregnutog sustava plinske kromatografije s masenom spektrskopijom (GC-MS).

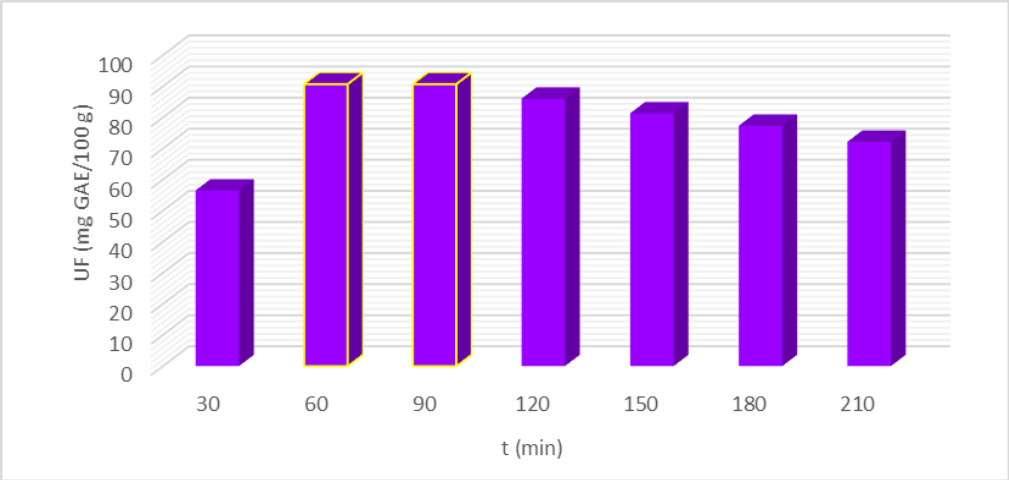
S ciljem ispitivanja antimikrobnog utjecaja dobivenih eteričnih ulja lista tršlje provedena je disk difuzijska metoda prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED.

## 4.1. Optimiranje uvjeta ekstrakcije BAM-a iz listova tršlje primjenom konvencionalne tehnike ekstrakcije

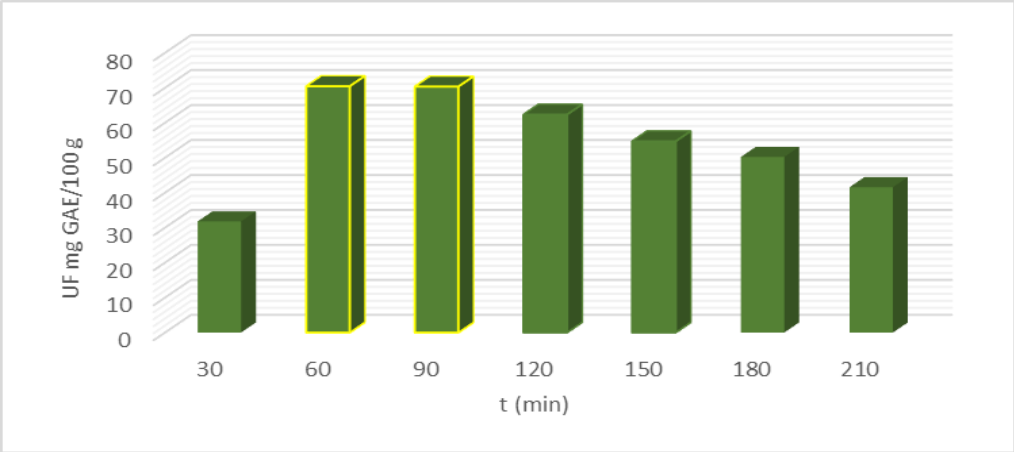
Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje konvencionalnom ekstrakcijom provedena je postupkom maceracije potpomognute miješanjem pri sobnoj temperaturi od 25 °C tijekom 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minuta primjenom otapala različite polarnosti, mono sustavom otapala (voda, 100 % etanol i metanol), te binarnim sustavom (80 % vodene otopine etanola i metanola) čiji su rezultati prikazani na slikama 17 – 19.




***Slika 17.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola tršlje dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom primjenom mono (voda, 100 % metanol i etanol) i binarnih sustava (80 % vodene otopine etanola i metanola) pri sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta




***Slika 18.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola tršlje dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom primjenom 80 % vodene otopine metanola pri sobnoj temperaturi tijekom 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minuta




***Slika 19.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola tršlje dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom primjenom 80 % vodene otopine etanola pri sobnoj temperaturi tijekom 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minuta

Rezultati spektrofotmetrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim konvencionalnom ekstrakcijom primjenom mono sustava otapala (voda, 100 % metanol i etanol) te binarnih sustava otapala (80 % vodene otopine metanola i etanola) su pokazali da su binarni sustavi učinkovitiji u ekstrakciji BAM-a iz lista tršlje (*Slika 17*). Najveći ekstrakcijski kapacitet tj. najveći maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje (90,71 mg GAE/100 g) dobiveni su

primjenom 80 % vodene otopine metanola. Potom slijede ekstrakti dobiveni s 80 % vodenom otopinom etanola (70,45 mg/GAE 100 g), 100 % metanola (65,11 mg/GAE 100 g), 100 % etanola (58,71 mg/GAE 100 g) i vode (44,05 mg/GAE 100 g).

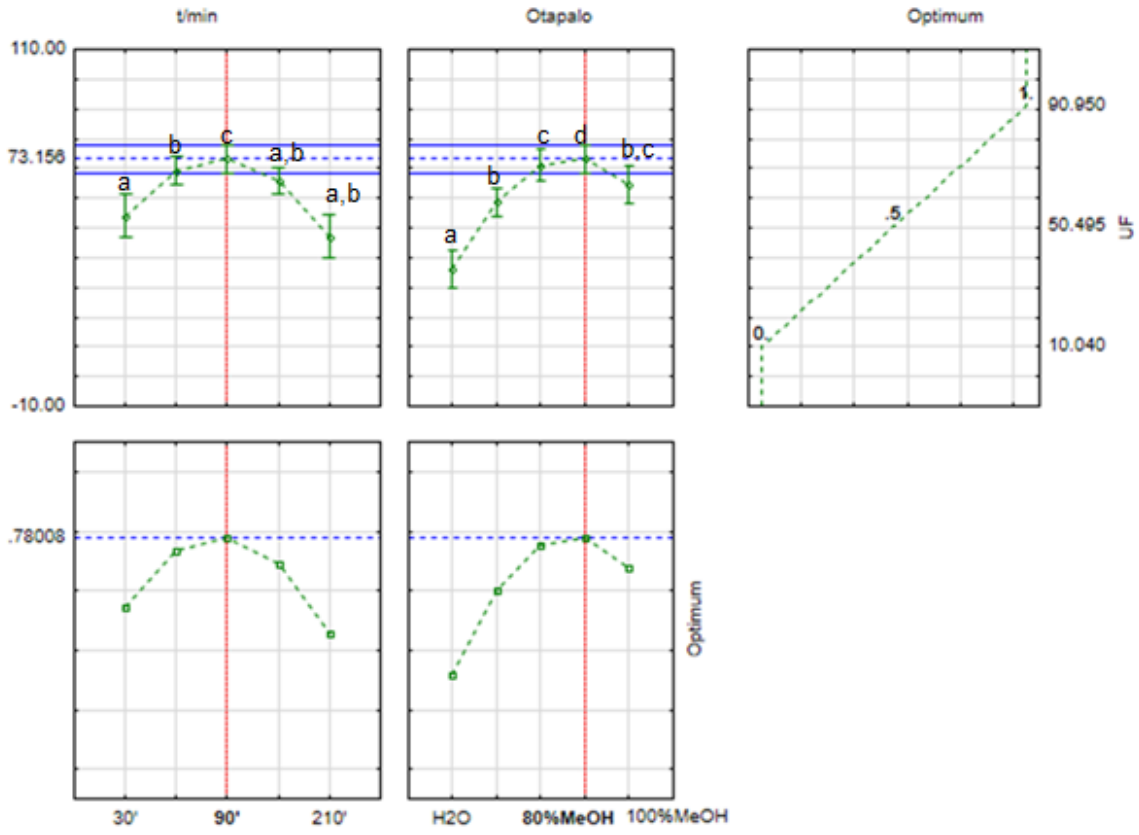
Odabir odgovarajućeg otapala ima značajan utjecaj na sastav i masene udjele fenolnih spojeva, a dodatak vodene faze organskim otapalima značajno doprinosi povećanju ekstrakcijskog kapaciteta (Galanakis i sur., 2013; Do i sur., 2014; Bhebhe i sur., 2016; Mohammedelnour i sur., 2017). Najčešće korištena otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva su metanol (Ross i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011), etanol (Altiok i sur., 2008; Wang i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011), aceton (Naczk i Shahidi, 2006) te etil acetat i njihove vodene otopine, koje su se pokazale kao najučinkovitije u izolaciji BAM-a iz biljnog materijala. Prema istraživanju koje su proveli Haas i sur. (2018) najveći maseni udjeli fenolnih spojeva iz grožda su ekstrahirani primjenom 80 % vodene otopine metanola u usporedbi s ekstrakcijom provedenom s 80 % vodenom otopinom etanola ili acetona. Al-Marazeeq i sur. (2016) proveli su istraživanje o utjecaju vrste otapala i uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline. Fenolne spojeve su ekstrahirali upotrebom četiri vrste otapala (80 % metanol, 80 % etanol, aceton i destilirana voda), a njihovi rezultati su pokazali da su najveći prinosi fenolnih spojeva dobiveni s primjenom 80 % vodene otopine metanola kao otapala, a najmanji s primjenom destilirane vode. Fecka i Turek (2008) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva iz timijana i mažurana upotrebom različitih vodenih otopina metanola (30, 50 i 70 %) u vremenu od 15-30 minuta te zaključili da je količina ekstrahiranih fenolnih spojeva značajno ovisila o udjelu vodene faze u otapalu. S ekološkog stajališta preporučena je upotreba manje toksičnih otapala kao što su etanol, *n*-butanol i izopropanol (Bartnick i sur., 2006) u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, iako se prema istraživanjima nekih autora primjenom metanola ekstrahiraju veći udjeli fenolnih spojeva (Ma i sur., 2009).

S ciljem postizanja maksimalnih masenih udjela fenolnih spojeva u ekstraktima, određivan je i utjecaj vremena trajanja konvencionalne ekstrakcije na količinu ovih spojeva u dobivenim ekstraktima. Konvencionalna ekstrakcija je provedena tijekom 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minuta primjenom 80 % vodenih otopina metanola i etanola za koje je u ovom istraživanju dokazano da omogućavaju dobivanje najvećih prinosa. Iz rezultata prikazanih na *Slikama 18 i 19* vidljivo je da povećanjem vremena ekstrakcije s 30 na 60 minuta prinosi ukupnih fenola u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje značajno mijenjaju, nakon čega je tijekom 90-te

minute nastupilo zasićenje te nije zabilježen daljnje povećanje prinosa. Produljenjem vremena ekstrakcije na 120, 150, 180 i 210 min, došlo je do postepenog ali značajnog opadanja prinosa ciljanih fenolnih spojeva. Razlog smanjenja masenog udjela ukupnih fenola produljenim vremenom ekstrakcije (120, 150, 180, 210 min) vjerojatno je posljedica oksidacije osjetljivih fenolnih spojeva zbog izlaganja kisiku (Fischer i sur., 2013; Cisse i sur., 2012).

Vrijeme ekstrakcije od 90 minuta se pokazalo dostatnim za ekstrakciju ukupnih fenola iz lista tršlje putem konvencionalne ekstrakcije uz primjenu 80 % vodenih otopina metanola i etanola. Primjena mono sustava (voda, 100 % metanol i etanol) kao otapala kod konvencionalne ekstrakcije je isključena u daljnjem istraživanju zbog dokazanog slabijeg ekstrakcijskog kapaciteta u odnosu na primjenu binarnih sustava otapala (80 % vodena otopina metanola i etanola).

***Statistička obrada utjecaja vremena i vrste otapala na maseni udio UF postupkom konvencionalne ekstrakcije***

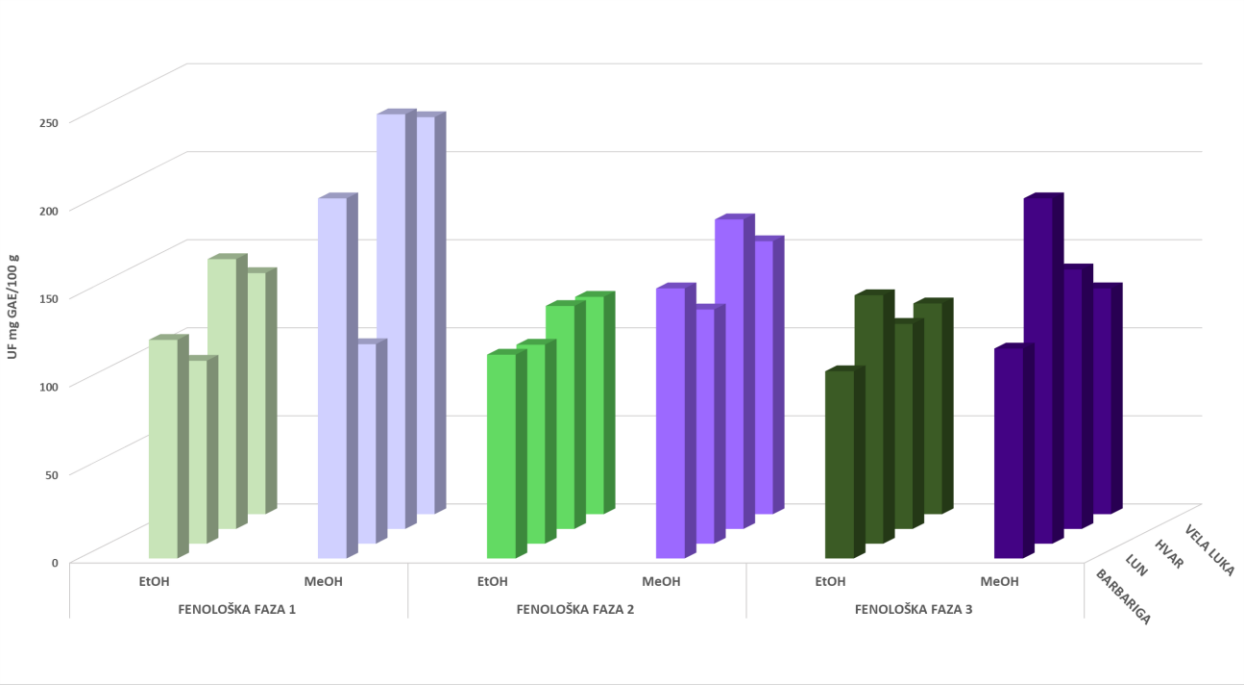



***Slika 20.*** Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenola iz lista tršlje postupkom konvencionalne ekstrakcije

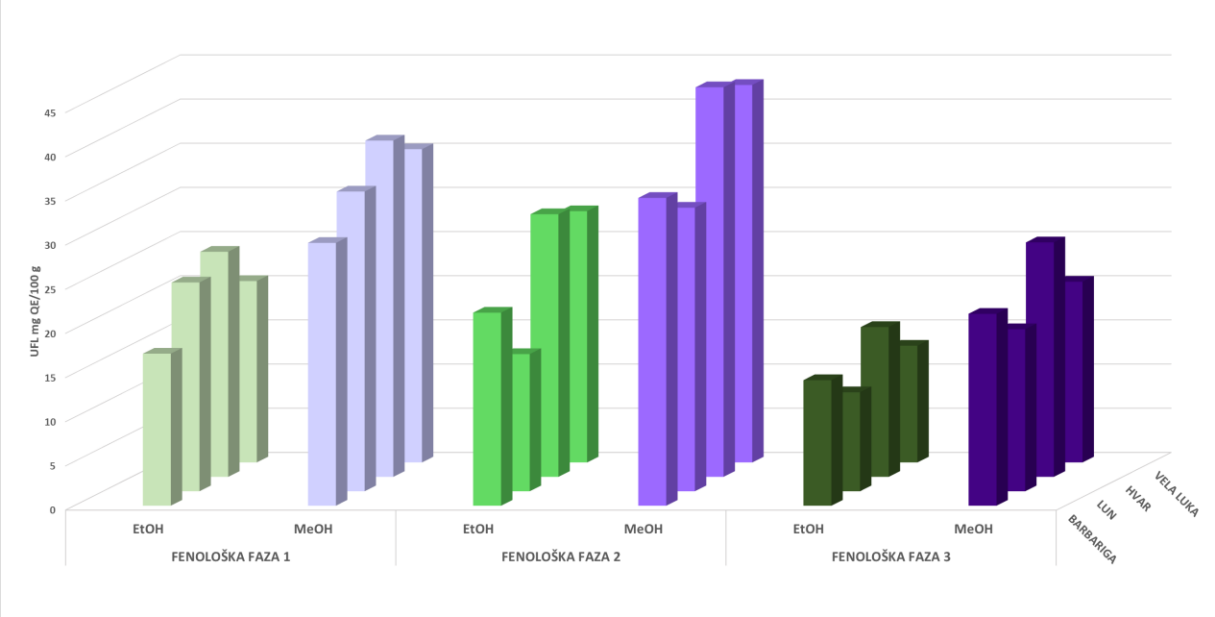
S ciljem definiranja optimalnih procesnih uvjeta za provođenje ekstrakcije BAM-a iz lista tršlje postupkom konvencionalne ekstrakcije primijenjena je metoda odzivnih površina, a koja se bazira na definiranju minimuma odzivne površine koji predstavlja optimalne procesne uvjete. Analiziran je utjecaj dvije varijable (vremena i otapala) na koncentraciju ukupnih fenola lista tršlje. Na *Slici 20* prikazani su dvodimenzionalni prikazi zavisnosti izlaznih varijabli i procesnim uvjetima te procijenjeni optimalni procesni uvjeti. Iz rezultata statističke obrade dobivenih rezultata prikazanih na *Slici 20* se može uočiti da vrijeme trajanja ekstrakcije i odabir otapala imaju značaj utjecaj na udio fenola. U pripremljenim ekstraktima lista tršlje udio ukupnih fenola je kvantificiran u rasponu od 10,00 mg GAE/g do 110 mg GAE/g dok prema modelu optimalni udio ukupnih fenola iznosi 73,156 mg GAE/g, a postiže se optimalnim vremenom trajanja ekstrakcije od 90 minuta i 80 % vodenom otopinom metanola kao otapalom.

### 4.1.1. Utjecaj lokacije i fenološke faze na masene udjele BAM-a u ekstraktima lista tršlje

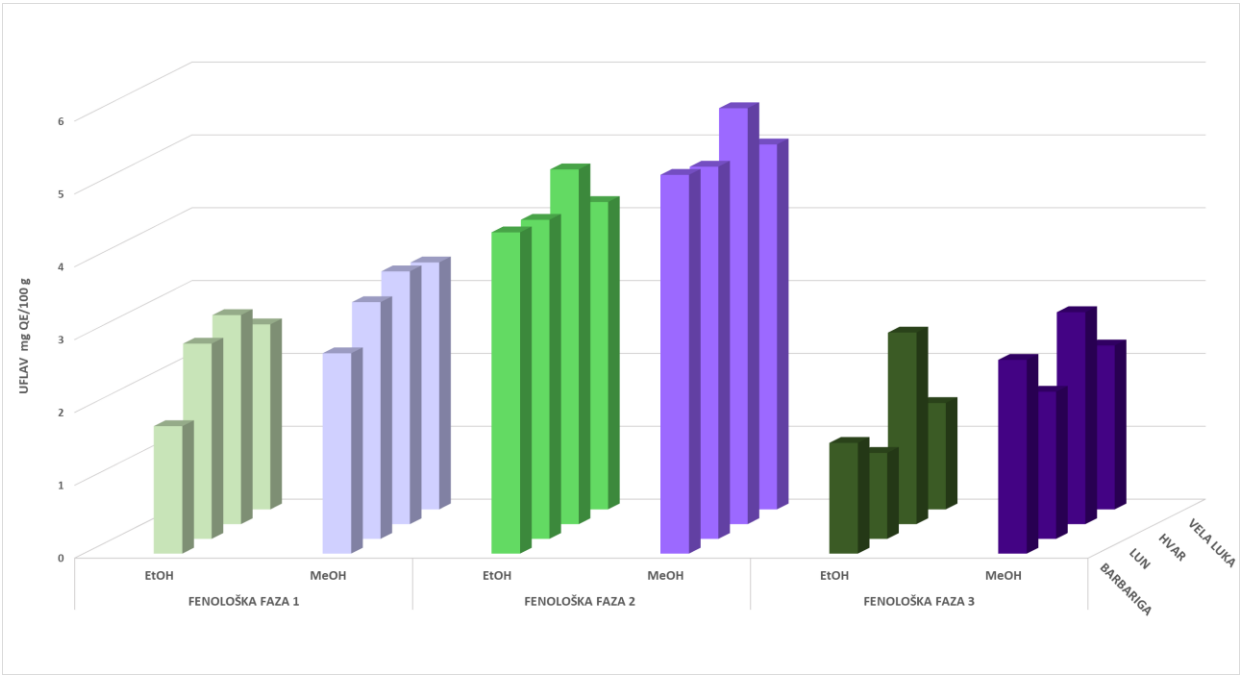
Na *Slikama 21 – 25* prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela ukupnih fenolna (UF), flavonoida (UFL), flavonola (UFLAV) i hidroksicimetnih kiselina (HCK) u ekstraktima lista tršlje dobivenih metodom konvencionalne ekstrakcije uz 80 % vodenu otopinu metanola i etanola kao otapala, iz uzoraka tršlje s četiri lokacije (Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka) branih tijekom tri fenološke faze (3.1.1.).



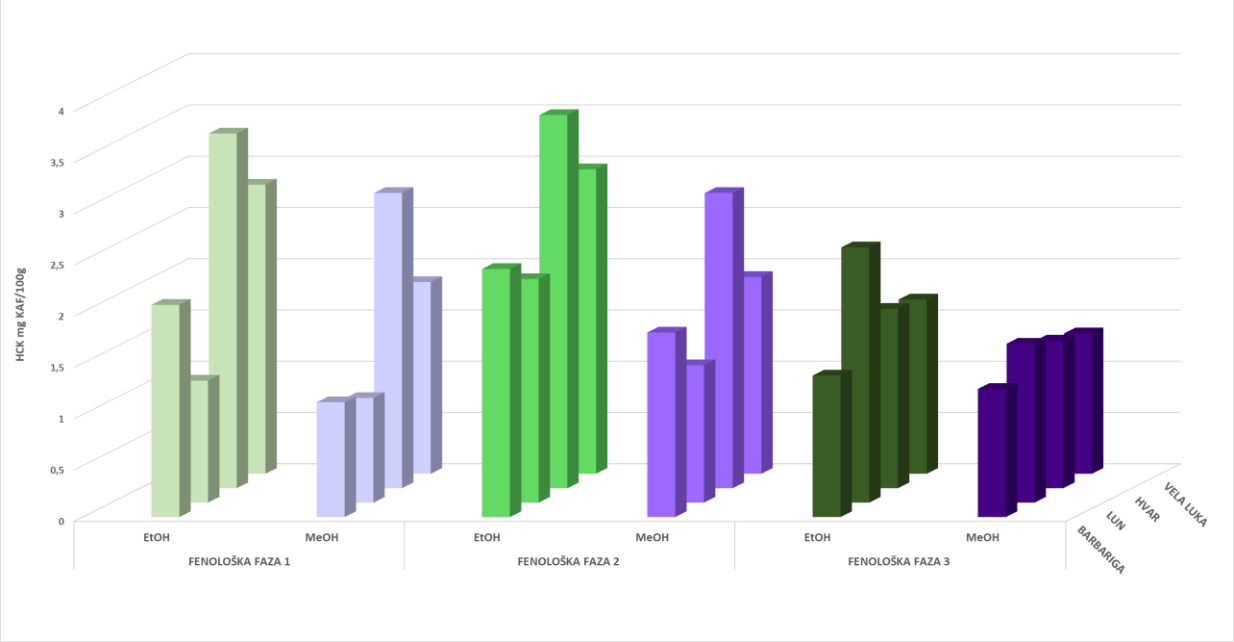

***Slika 21.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih fenola u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima, dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom lista tršlje uzorkovanih sa 4 lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom 3 fenološke faze




***Slika 22.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih flavonoida u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima, dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom lista tršlje uzorkovanih sa 4 lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom 3 fenološke faze




***Slika 23.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih flavonola u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima, dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom lista tršlje uzorkovanih sa 4 lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom 3 fenološke faze




***Slika 24.*** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima, dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom lista tršlje uzorkovanih sa 4 lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom 3 fenološke faze

Najveći maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina su određeni u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim na lokaciji Hvar, ali tijekom različitih fenoloških faza. Najveći maseni udjeli UF u metanolnim ekstraktima lista tršlje iznosili su 235,45 ± 1,88 mg GAE/g, UFL 44,10 ± 0,57 mg QE/100 g, UFLAV 5,71 ± 0,08 mg QE/100 g, HCK 2,88 ± 0,04 mg KAF/100 g, dok su u etanolnim ekstraktima vrijednosti masenih udjela UF i UFL bile u prosjeku manje za 32 %, UFLAV za 14 %, a HCK veće za 26,38 %.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja su pokazali da su najniže vrijednosti masenih udjela UF, UFL, UFLAV i HCK u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje određene u ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim na lokaciji Lun ali također tijekom različitih fenoloških faza. Vrijednosti najnižih masenih udjela u metanolnim ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka ubranim sa lokacije Lun su za UF iznosile 113,30 ± 0,09 mg GAE/g, UFL 18,35 ± 0,45 QE/100 g, UFLAV 2,02 ± 0,10 QE/100 g te HCK 1,02 ± 0,04 KAF/100 g, dok u etanolnim ekstraktima vrijednosti masenih udjela UF su bile manje za 8,33 %, UFL i UFLAV u prosjeku za 38 % manje, a maseni udjeli HCK veće za 16 %.

Rezultati masenih udjela dobivenih sprektrofotometrijskom metodom, ukazuju na razlike između masenih udjela svih promatranih fenolnih spojeva dobivenih u obje vrste ektrakata iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Lun i Hvar što se može pripisati razlici u nadmorskoj visini. Istraživanja su pokazala da je visina jedan od abiotičkih čimbenika koja je povezana sa nizom promjena u okolišnim čimebnicima kao što su temperatura, padaline, jakost sunčeve svjetlosti i UV-B zračenje (Kofidis i sur., 2003). Uzorci tršlje na lokaciji Lun su rasli zaklonjeni okolonom florom na nadmorskoj visini od 15 m, dok su uzorci tršlje na lokaciji Hvar rasli na 330 m nadmorske visine direktno izloženi sunčevoj svjetlosti. Promjene u temperaturi i izloženosti sunčevoj svjetlosti uzrokuju aktivaciju biljnog obrambenog mehanizma na način da se aktivira proizvodnja sekundarnih metabolita kao što su fenolne kiseline i flavonoidi, a koji posjeduju sposobnost apsorpcije ultraljubičastih zraka (Wulff i sur., 1999). Mnogobrojna istraživanja su pokazala da je porast u masenim udjelima fenolnih spojeva posljedica obrambenog mehanizama biljke kako bi se uspješno nosila sa stresom nastalim zbog promjena u abiotičkim čimbenicima kao što je razlika u nadmorskoj visini (Bravo i sur., 2012; Körner, 2007). Rezultati istraživanja koje su proveli Kaur i sur. (2016) su pokazali da uzorci biljke *Ehinacea purpurea* koji su rasli na većoj nadmorskoj visini su za 3,73 puta bogatiji fenolnim spojevima od uzoraka biljke koji su rasli na nižoj nadmorskoj visini. Prema istraživanju koje su poveli Nchabeleng i sur. (2012), nadmorska visina se pokazala kao ključni abiotički faktor koji utječe na masene udjele fenolnih spojeva u biljci *Athrixia phylicoides*. Naime, u njihovom istraživanju najveći maseni udjeli fenolnih spojeva su kvantificirani u uzorcima biljke koje je rasla na 1410 m nadmorske visine.

Iz rezultata prikazanih na *Slikama 21 – 24* može se uočiti da vrijednosti masenih udjela UFK i HCK u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka ubranim sa lokacija Barbariga, Hvar i Vela Luka su opadali iz FF1 do FF 3 u kojoj su kvantificirani najmanji maseni udjeli. Prema istraživanju koje su proveli Yosr i sur. (2018), najveće vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje porijeklom iz Tunisa su kvantificirane tijekom FF 1 (vegetativna faza), a najmanje tijekom FF 3 (faza zrelog ploda), što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Vrijednosti masenih udjela UFL i UFLAV su pokazali porast iz FF 1 u FF 2, nakon čega je uslijedio nagli pad tijekom FF 3. Veći maseni udjeli ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina, određeni tijekom FF 1, su posljedica uloge fenolnih kiselina kao prekursora u biosintezi čalkona, flavonoida, lignana i antocijana (Alam i sur., 2016).

Za razliku od ostale tri lokacije, u uzorcima tršlje ubranim sa lokacije Lun se pokazao drugačiji trend rasta i pada masenih udjela BAM-a tijekom različitih fenoloških faza tijekom kojih je došlo do porasta UF i HCK od FF 1 do FF3, odnosno smanjenja masenih udjela UFL i UFLAV što se može pripisati utjecaju lokalnih klimatskih čimbenika (*Tablica 1*).

### 4.1.2. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima lista tršlje primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) uz UV Photo Diode Array (PDA) detekciju

Sastav i masene koncentracije fenolnih spojeva određeni u ekstraktima lista tršlje dobivenim konvencionalnom ekstrakcijom iz uzorka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga, Pag, Hvar i Vela Luka tijekom 3 fenološke faze su prikazani u *Tablicama 13* i *14*.

***Tablica 13.*** Rezultati kromatografskog određivanja masenih koncentracija pojedinačnih fenolnih kiselina u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje ubranih sa 4 lokacije (Brabariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom tri fenološke faze biljke

| Otapalo | Lokacija | Fenološka faza | MG-Glu[A] | GA | 5-GQA | 3,5-diGQA | 3,4,5-tGQA | CA | CA (der.) | UFK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | γ (mg/L) | | | | | | | |
| φ(metanol)= 80 % | Barbariga | 1 | (54,34±0,34)$^{j}$ | (27,50±0,12)$^{c,d,e}$ | (106,4±0,44)$^{o}$ | (22,36±0,27)$^{d,e,f,g}$ | (57,52±0,40)$^{p}$ | (10,3±0,22)$^{e}$ | (0,91±0,03)$^{b}$ | (279,33±0,35)$^{q}$ |
| | | 2 | (32,54±0,48)$^{d}$ | (16,53±0,31)$^{a,b,c}$ | (114,5±0,21)$^{p}$ | (21,34±0,41)$^{d,e,f,g}$ | (20,21±0,38)$^{e,f}$ | - | - | (205,15±1,59)$^{m}$ |
| | | 3 | (28,97±0,30)$^{b,c}$ | (8,09±0,31)$^{a,b,c}$ | (48,54±0,37)$^{e}$ | (31,61±0,19)$^{g,h}$ | (19,61±0,19)$^{e}$ | - | - | (136,82±0,54)$^{e}$ |
| | Lun | 1 | (69,34±0,56)$^{l}$ | - | (53,72±0,33)$^{f}$ | (32,39±0,45)$^{g,h}$ | (25,41±0,11)$^{j}$ | (2,50±0,16)$^{c}$ | - | (183,36±0,83)$^{l}$ |
| | | 2 | (30,22±0,60)$^{c}$ | (30,34±0,54)$^{c,d,e}$ | (130,6±0,34)$^{q}$ | (18,36±0,25)$^{c,d,e,f}$ | (10,58±0,29)$^{b}$ | - | - | (220,05±1,20)$^{n}$ |
| | | 3 | (33,14±0,23)$^{d}$ | (33,6±0,27)$^{d,e}$ | (129,3±0,15)$^{q}$ | (24,52±0,30)$^{e,f,g}$ | (21,31±0,42)$^{f,g}$ | - | - | (241,90±0,27)$^{o}$ |
| | Hvar | 1 | (96,25±0,28)$^{p}$ | (25,49±0,33)$^{c,d,e}$ | (186,5±0,43)$^{t}$ | (95,51±0,24)$^{k}$ | (53,51±0,17)$^{o}$ | - | - | (457,24±1,10)$^{v}$ |
| | | 2 | (92,41±0,31)$^{o}$ | (30,13±0,30)$^{c,d,e}$ | (137,4±0,30)$^{r}$ | (69,62±0,37)$^{x}$ | (23,26±0,35)$^{h,i}$ | - | - | (352,84±0,17)$^{s}$ |
| | | 3 | (50,43±0,36)$^{i}$ | (26,72±0,43)$^{c,d,e}$ | (99,47±0,44)$^{m}$ | (52,05±0,23)$^{j}$ | (38,48±0,36)$^{m}$ | - | - | (267,15±0,88)$^{p}$ |
| | Vela Luka | 1 | (108,45±0,12)$^{q}$ | (24,51±0,27)$^{c,d,e}$ | (147,3±0,50)$^{s}$ | (92,33±0,32)$^{k}$ | (43,49±0,43)$^{n}$ | (0,78±0,03)$^{a}$ | - | (416,85±0,52)$^{u}$ |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | (42,37±0,33)$^{g}$ | (16,44±0,45)$^{a,b,c}$ | (67,44±0,38)$^{i}$ | (28,40±0,25)$^{f,g}$ | (22,46±0,39)$^{g,h}$ | - | - | (177,11±0,81)$^{k}$ |
| | | 3 | (38,53±0,36)$^{e,f}$ | (21,95±0,14)$^{a,b,c,d,e}$ | (83,5±0,21)$^{k}$ | (16,37±0,38)$^{b,c,d,e}$ | (12,60±0,22)$^{c}$ | - | - | (172,95±0,72)$^{j}$ |
| **φ(etanol)= 80 %** | Barbariga | 1 | (37,32±0,24)$^{e}$ | (26,45±0,33)$^{c,d,e}$ | (59,38±0,24)$^{h}$ | - | (24,40±0,23)$^{i,j}$ | - | - | (147,55±0,38)$^{f}$ |
| | | 2 | (27,81±0,16)$^{b}$ | - | (19,52±0,36)$^{b}$ | (12,64±0,35)$^{b,c,d}$ | (13,20±0,15)$^{c}$ | - | - | (73,16±0,61)$^{b}$ |
| | | 3 | (5,39±0,29)$^{a}$ | (0,45±0,04)$^{d}$ | (2,59±0,37)$^{a}$ | - | (0,67±0,03)$^{a}$ | (7,63±0,35)$^{d}$ | (0,58±0,03)$^{a}$ | (17,31±0,52)$^{a}$ |
| | Lun | 1 | (43,40±0,37)$^{g}$ | (6,54±0,36)$^{a,b}$ | (22,51±0,40)$^{c}$ | (13,49±0,35)$^{b,c,d,e}$ | (19,45±0,31)$^{e}$ | (1,58±0,03)$^{b}$ | - | (106,97±0,49)$^{c}$ |
| | | 3 | (28,37±0,17)$^{b}$ | (19,29±0,40)$^{a,b,c,d,e}$ | (53,35±0,26)$^{f}$ | - | (26,73±0,29)$^{k}$ | - | - | (127,74±0,22)$^{d}$ |
| | | 2 | (43,48±0,32)$^{g}$ | (26,33±0,31)$^{c,d,e}$ | (66,59±0,37)$^{i}$ | (9,52±0,41)$^{a,b,c}$ | (23,33±0,09)$^{h,i}$ | - | - | (169,25±1,02)$^{i}$ |
| | Hvar | 1 | (79,61±0,43)$^{n}$ | (66,55±0,18)$^{f}$ | (104,42±0,70)$^{n}$ | (47,16±0,14)$^{i,j}$ | (73,64±0,46)$^{s}$ | - | - | (371,38±1,45)$^{t}$ |
| | | 2 | (71,52±0,29)$^{m}$ | (51,31±0,23)$^{f}$ | (91,45±0,25)$^{l}$ | (40,63±0,28)$^{h,i}$ | (69,20±0,19)$^{r}$ | - | - | (324,10±1,14)$^{s}$ |
| | | 3 | (39,32±0,34)$^{f}$ | (21,52±0,27)$^{a,b,c,d,e}$ | (55,57±0,27)$^{g}$ | (19,10±0,27)$^{c,d,e,f}$ | (44,52±0,41)$^{n}$ | (0,62±0,05)$^{a}$ | - | (180,64±0,87)$^{l}$ |
| | Vela Luka | 1 | (58,11±0,21)$^{k}$ | (55,47±0,41)$^{f}$ | (80,47±0,25)$^{j}$ | (48,02±0,19)$^{i,j}$ | (67,54±0,41)$^{q}$ | - | - | (309,60±2,13)$^{r}$ |
| | | 2 | (49,57±0,20)$^{i}$ | (16,55±0,32)$^{a,b,c,d}$ | (14,55±0,25)$^{b,c,d,e}$ | (14,55±0,25)$^{b,c,d,e}$ | (34,57±0,29)$^{l}$ | - | - | (157,16±0,55)$^{h}$ |
| | | 3 | (45,33±0,21)$^{h}$ | (24,38±0,30)$^{b,c,d,e}$ | (58,35±0,30)$^{h}$ | (5,47±0,25)$^{a,b}$ | (17,68±1,18)$^{d}$ | - | - | (151,22±2,21)$^{g}$ |

$^{a-v}$Rezultati u pojedinačnim linijama označeni istim slovima se statistički značajno ne razlikuju pri p≤0,05.

$^{A}$Mono-galoil glukoza (MG-Glu), Galna kiselina (GA), 5-*O*-galoilkina kiselina (5-GKK), 3,5-di-*O*-galoilkina kiselina (3,5-diGKK), 3,4,5-tri-*O*- galoilkina kiselina (3,4,5-tGKK), Kafeinska kiselina (CA), Kafeinska kiselina derivirana [CA (der)], ukupne fenolne kiseline (UFK)

1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

***Tablica 14.*** Rezultati kromatografskog određivanja masenih koncentracija flavonola glikozida i katehina u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje uzorkovanih sa 4 lokacije (Brabariga, Lun, Hvar, Vela Luka) tijekom tri fenološke faze biljke

| Otapalo | Lokacija | Fenološka faza | My-G[A] | My-Glu | My-R | Que-R | F-G der 1 | UFG | katehin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | γ (mg/L) | | | | | | |
| φ(metanol)= 80 % | Barbariga | 1 | (15,27±0,43)$^{i}$ | (30,43±0,21)$^{g}$ | (51,56±0,34)$^{j}$ | (11,40±0,37)$^{h}$ | - | (108,67±0,15)$^{i}$ | (45,35±0,25)$^{i}$ |
| | | 2 | (20,60±0,21)$^{k}$ | (48,50±0,36)$^{m}$ | (93,44±0,30)$^{q}$ | (14,74±0,34)$^{j}$ | - | (177,29±0,23)$^{o}$ | (30,25±0,20)$^{f}$ |
| | | 3 | (10,56±0,28)$^{f}$ | (18,46±0,28)$^{c}$ | (30,50±0,33)$^{f}$ | (6,48±0,35)$^{c,d,e}$ | (1,48±0,23)$^{b,c}$ | (67,48±0,16)$^{e}$ | (8,12±0,16)$^{a}$ |
| | Lun | 1 | (13,46±0,21)$^{h}$ | (41,96±0,31)$^{k}$ | (63,35±0,26)$^{l}$ | (15,59±0,30)$^{j,k}$ | - | (134,35±0,12)$^{l}$ | (23,36±0,34)$^{c}$ |
| | | 2 | (17,70±0,26)$^{j}$ | (41,39±0,43)$^{k}$ | (59,97±0,13)$^{k}$ | (9,42±0,34)$^{g}$ | - | (128,49±0,09)$^{k}$ | (30,57±0,31)$^{f}$ |
| | | 3 | (8,45±0,32)$^{e}$ | (17,86±0,15)$^{c}$ | (26,41±0,35)$^{d,e}$ | (9,30±0,34)$^{g}$ | - | (62,03±0,11)$^{d}$ | (10,50±0,27)$^{b}$ |
| | Hvar | 1 | (20,56±0,26)k | (41,64±0,29)k | (35,38±0,32)g | (5,56±0,33)b,c | - | (166,72±0,20)$^{n}$ | (39,4±0,18)h |
| | | 2 | (26,58±0,42)m | (56,09±0,04)n | (72,60±0,16)o | (11,44±0,30)h | - | (183,72±0,17)$^{p}$ | (35,11±0,52)g |
| | | 3 | (20,66±0,21)k | (36,37±0,37)j | (97,52±0,32)r | (23,62±0,37)l | (5,55±0,26)e | (103,14±0,17)$^{h}$ | (28,38±0,23)d |
| | Vela Luka | 1 | (20,24±0,26)$^{k}$ | (57,44±0,46)$^{o}$ | (75,50±0,32)$^{p}$ | (23,55±0,42)$^{l}$ | - | (155,00±0,11)$^{m}$ | (29,53±0,40)$^{e}$ |
| | | 2 | (10,62±0,35)$^{f}$ | (22,43±0,32)$^{e}$ | (20,42±0,44)$^{b}$ | (4,42±0,29)$^{a,b}$ | - | (177,73±0,12)$^{o}$ | (35,48±0,38)$^{g}$ |
| | | 3 | (17,50±0,25)$^{j}$ | (46,48±0,35)$^{l}$ | (62,50±0,28)$^{l}$ | (24,22±0,25)$^{l}$ | (5,29±0,24)$^{e}$ | (57,88±0,13)$^{c}$ | (27,48±0,23)$^{j}$ |
| φ(etanol)= 80 % | Barbariga | 1 | (8,24±0,14)$^{d,e}$ | (28,19±0,30)$^{e}$ | (25,18±0,15)$^{d}$ | (5,49±0,23)$^{b,c}$ | (0,81±0,03)$^{a}$ | (67,91±0,24)$^{e}$ | - |
| | | 2 | (10,63±0,42)$^{f}$ | (30,28±0,14)$^{g}$ | (69,57±0,36)$^{n}$ | (7,56±0,27)$^{d,e,f}$ | (1,23±0,14)$^{a,b}$ | (119,28±0,18)$^{j}$ | - |
| | | 3 | (7,43±0,27)$^{c,d}$ | (19,81±0,18)$^{d}$ | (27,62±0,21)$^{e}$ | (5,41±0,30)$^{b,c}$ | (1,55±0,27)$^{b,c}$ | (61,83±0,26)$^{d}$ | - |
| | Lun | 1 | (6,59±0,37)$^{c}$ | (25,57±0,35)$^{f}$ | (48,47±0,30)$^{i}$ | (8,41±0,31)$^{f,g}$ | (1,51±0,23)$^{b,c}$ | (96,35±0,14)$^{g}$ | - |
| | | 2 | (10,50±0,32)$^{f}$ | (28,65±0,18)$^{h}$ | (49,42±0,34)$^{i}$ | (6,31±0,18)$^{c,d}$ | (1,46±0,15)$^{b,c}$ | (90,54±0,17)$^{f}$ | - |
| | | 3 | (2,57±0,27)$^{a}$ | (8,12±0,09)$^{a}$ | (17,40±0,26)$^{a}$ | (4,58±0,23)$^{a,v}$ | (1,44±0,31)$^{b,c}$ | (34,11±0,18)$^{a}$ | - |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hvar | 1 | (10,51±0,31)$^{f}$ | (25,29±0,15)$^{f}$ | (27,65±0,18)$^{e}$ | (3,59±0,23)$^{a}$ | (1,43±0,27)$^{b}$ | (129,71±0,16)$^{k}$ | - |
| | | 2 | (23,27±0,21)$^{l}$ | (48,02±0,13)$^{m}$ | (74,50±0,14)$^{p}$ | (8,14±0,14)$^{e,f,g}$ | (1,50±0,23)$^{b,c}$ | (155,43±0,20)$^{m}$ | - |
| | | 3 | (10,80±0,16)$^{f,g}$ | (31,35±0,24)$^{h}$ | (66,62±0,31)$^{m}$ | (16,31±0,15)$^{j,k}$ | (4,63±0,22)$^{d}$ | (68,48±0,22)$^{e}$ | - |
| | Vela Luka | 1 | (10,66±0,28)$^{f}$ | (35,28±0,21)$^{i}$ | (43,50±0,33)$^{h}$ | (12,16±0,16)$^{h}$ | (1,98±0,09)$^{c}$ | (103,57±0,31)$^{h}$ | - |
| | | 2 | (4,23±0,24)$^{b}$ | (14,29±0,16)$^{b}$ | (22,53±0,41)$^{c}$ | (3,53±0,10)$^{a}$ | (1,52±0,20)$^{b,c}$ | (118,91±0,23)j | - |
| | | 3 | (11,59±0,17)$^{g}$ | (36,58±0,36)$^{j}$ | (49,55±0,28)$^{i}$ | (16,56±0,27)$^{k}$ | (4,62±0,24)$^{d}$ | (46,10±0,23)$^{b}$ | - |

$^{a\text{-}r}$Rezultati u pojedinačnim linijama označeni istim slovima se statistički značajno ne razlikuju pri p≤0,05.
$^{A}$ Miricetin glukuronid (My-G), miricetin glukozid (My-Glu), miricetin ramnozid (My-R), kvercetin ramnozid (Que-R), flavonol-glikozid der 1 (Fl-Gly der 1); ukupni flavonol glikozidi (UFG)
1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

U analiziranim metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje, identificirano i kvantificirano je 7 fenolnih kiselina (FK) (monogaloil-glukoza, galna kiselina, 5-*O*-galoilkina kiselina, 3,5-digaloilkina kiselina, 3,4,5-trigaloilkina kiselina, kafeinska kiselina i derivirana kafeinska kiselina) (*Tablica 13*) i 5 flavonol glikozida (miricetin-3-*O*-glukuronid, miricietin-3-*O*-glukozid, miricetin-3-*O*-ramnozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid i derivirani flavonol glikozid 1) te flavanol katehin (*Tablica 14*) što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Mehenni i sur. (2016).

***Ukupne fenolne kiseline (UFK)***

5-*O*-galoilkina kiselina je određena kao dominantna fenolna kiselina tijekom FF 1, s vrijednostima masenih koncentracija u rasponu od 53,72 mg/L do 186,50 mg/L u metanolnim, odnosno od 22,51 mg/L do 104,42 mg/L u etanolnim ekstraktima. Prema kvantificiranim masenim koncentracijama po padajućem nizu slijede mono-galoil glukoza, 3,5-digaloilkina kiselina, 3,4,5-trigaliolkina kiselina, galna kiselina i kafeinska kiselina (*Tablica 13*).

Masene koncentracije UFK određene u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje su iznosile od 279,33 mg/L do 457,24 mg/L odnosno od 106,97 mg/L do 371,38 mg/L. Razlike u kvantificiranim masenim koncentracijama fenolnih spojeva su posljedica odabira otapala (80 % vodena otopina metanola ili etanola). Prema istraživanju koje su proveli Bhebe i sur. (2016) poznato je da odabir odgovarajućeg otapala ima značajan utjecaj na ekstrahirani sastav fenolnih spojeva, te da binarni sustavi kao što su vodene otopine imaju veći ekstrakcijski kapacitet (Do i sur., 2014; Galanakis i sur., 2013).

Iz rezultata utjecaja lokacije na masene koncentracije UFK koji su prikazani u *Tablici 15* može se uočiti da su najveće vrijednosti masenih koncentracija UFK određene u metanolnim i etanolnim ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar (457,24 ± 1,10 mg/L, etanol 371,38 ± 1,45 mg/L), a najmanje vrijednosti u ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Barbariga (136,82 ± 0,54, odnosno 17,31 ± 0,52 mg/L).

Osim u ovisnosti o lokaciji, iz rezultata prikazanih u *Tablici 14* uočene su značajne razlike u vrijednostima masenih koncentracija UFK i u ovisnosti o fenološkoj fazi. Najveće vrijednosti masenih koncentracija UFK određene su u obje vrste ekstrakata dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga, Hvar i Vela Luka tijekom FF1, a koje su tijekom daljnjeg vegetacijskog procesa (od FF 1 do FF 3) pokazali trend opadanja. Kao i kod rezultata masnih udjela UFK određenih spektrofotometrijom, metanolni i etanolni ekstrakti lista tršlje ubranim sa lokacije

Lun su se pokazali kao iznimka s porastom vrijednosti masenih koncentracija polazeći od FF 1 do FF 3 tijekom koje su određene najveće vrijednosti masenih koncentracija UFK (241,90 ± 0,27, odnosno 1427,74 ± 0,22 mg/L).

Osim sličnih abiotičkih čimbenika tj. bioklimatskih uvjeta uzduž Jadranske obale, morofološki izgled biljke koji je posljedica utjecaja abiotičkih čimbenika na razvoj biljke, ima značajan utjecaj na sastav i količinu fenolnih spojeva. Ekstrakti lista tršlje dobiveni iz uzoraka ubranim sa lokacija Barbariga, Hvar i Vela Luka su ubrani sa biljke u formi grma koja je slobodno rasla nezaklonjena ostalom florom što je tršlji omogućilo neometani pristup sunčevoj svjetlosti, dok su uzorci lista tršlje sa lokacije Lun brani sa tršlje u obliku stabla koje je bilo zaklonjeno ostalom rastućom florom (*Olea europaea* i *Pistacia terebinthus*) bez direktnog pristupa sunčevoj svjetlosti. Prema istraživanju koje su proveli Linatoc i sur. (2018), izlaganjem lišća *M. indica* direktnoj sunčevoj svjetlosti je uzrokovalo akumulaciju većih količina fenolnih spojeva u usporedbi s onim biljkama koje su rasle u hladu, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Istraživanjem koje su proveli Liu i sur. (2016), dokazali su da postoji pozitivna korelacija između povećanja nadmorske visine, temperature zraka i ukupnih flavonoida u biljci *Lycium chinense*, što je posljedica povećanja ultraljubičastog zračenja.

***Ukupni flavonol glikozidi (UFG)***

Miricetin ramnozid je određen kao dominantni flavonol glikozid tijekom FF 3, s vrijednostima masenih koncentracija u rasponu od 20,42 mg/L do 97,52 mg/L u metanolnim, odnosno od 17,40 mg/L do 74,50 mg/L u etanolnim ekstraktima. Prema kvantificiranim masenim koncentracijama po padajućem nizu su slijedili spojevi miricetin glukozid, miricetin glukuronid, kvervetin ramnozid te flavonol-glikozid der 1 (*Tablica 14*).

U ovisnosti o lokaciji, najveće vrijednosti masenih koncentracija UFG su određene u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar (183,83 ± 0,17, odnosno 155,43 ± 0,20 mg/L), a najmanje u obje vrste ekstrakata dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun (62,03 ± 0,11 odnosno 34,11 ± 0,18 mg/L).

U ovisnosti o fenološkoj fazi, najveće vrijednosti masenih koncentracija određene su tijekom FF 2 u metanolnim i etanolnim ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranima sa lokacija Barbariga, Hvar i Vela Luka, dok su u ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranima sa lokacije Lun najveće vrijednosti masenih koncentracija određene tijekom tijekom FF 1. Rezultati

su u skladu s istraživanjem koje su proveli Jakovljević i sur. (2013). Njihovi rezultati su pokazali da se najniže masene koncentracije flavonoida u biljci *Chelidonium majus* postižu tijekom početka cvatnje, te da se isti povećavaju tijekom fenološke faze ranog ploda.

Najveće masene koncentracije katehina su određene u ekstraktima lista tršlje dobivene iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Barbariga (43,35 ± 0,25 mg/L) tijekom FF 1, u ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun tijekom FF 2 (30,57 ± 0,31 mg/L), a u ekstraktima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija lokacija Hvar i Vela Luka tijekom FF 2 (39,40 ± 0,18 mg /L odnosno 35,48 ± 0,38 mg/L).

***Statistička obrada utjecaja otapala, lokacije i fenološke faze tršlje na sastav BAM-a***

U *Tablici 15* su prikazani statistički rezultati utjecaja ekstrakcijskog otapala, lokacije i fenološke faze tršlje na sastav BAM u ekstraktima lista tršlje, dok su u *Tablici 18* prikazani statistički rezultati kombiniranog utjecaja lokacije i vremena berbe na sastav BAM-a metanolnih i etanolnih ekstrakata lista tršlje

***Tablica 15.*** Utjecaj ekstrakcijskog otapala, lokacije i fenološke faze tršlje na sastav BAM u ekstraktima lista tršlje

| **Ekstrakcijski parametri** | **N** | **Bioaktivni spojevi (mg/L)** | |
|---|---|---|---|
| **Otapalo** | | **UFK** | **UFG** |
| | | p<0,01* | p<0,01* |
| φ(metanol)=80 % | 36 | (259,23±0,17)$^{b}$ | (126,87±0,12)$^{b}$ |
| φ(etanol)=80 % | 36 | (178,05±0,17)$^{a}$ | (91,02±0,12)$^{a}$ |
| **Lokacija** | | p<0,01* | p<0,01* |
| Barbariga | 18 | (143,22±0,24)$^{a}$ | (100,41±0,17)$^{b}$ |
| Lun | 18 | (174,88±0,24)$^{b}$ | (90,98±0,17)$^{a}$ |
| Hvar | 18 | (325,56±0,24)$^{d}$ | (134,53±0,17)$^{d}$ |
| Vela Luka | 18 | (230,89±0,24)$^{c}$ | (109,86±0,17)$^{c}$ |

| **Fenološka faza[A]** | | p<0,01* | p<0,01* |
|---|---|---|---|
| 1 | 24 | (284,03±0,21)[c] | (120,29±0,15)[b] |
| 2 | 24 | (204,72±0,21)[b] | (143,92±0,15)[c] |
| 3 | 24 | (167,16±0,21)[a] | (62,63±0,15)[a] |

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Prema Tukey's HSD testu ista slova unutar stupca nisu statistički različita kod p<0,01.
*Statistički značajan faktor kod 99% pouzdanosti
N – broj ponavljanja; UFK – ukupne fenolne kiseline; UFG – ukupni flavonol glikozidi
[A]1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

***Tablica 16.*** Kombinirani utjecaj lokacije i vremena berbe na sastav BAM-a metanolnih i etanolnih ekstrakata lista tršlje

| **Ekstrakcijski parametri** | | | **BAM (mg/L)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Lokacija** | **Vrijeme berbe** | N | **φ(metanol)=80 %** | | **φ(etanol)=80 %** | |
| | | | **UFK** | **UFG** | **UFK** | **UFG** |
| | | | p<0,01* | p<0,01* | p<0,01* | p<0,01* |
| Barbariga | 1 | 3 | (279,33 ± 0,49)$^{i}$ | (108,67± 0,51)$^{e}$ | (147,55 ± 0,66)$^{e}$ | (67,91 ± 0,33)$^{d}$ |
| Barbariga | 2 | 3 | (205,15 ± 0,49)$^{e}$ | (177,29 ± 0,51)$^{j}$ | (73,16 ± 0,66)$^{b}$ | (119,28 ± 0,33)$^{i}$ |
| Barbariga | 3 | 3 | (136,82 ± 0,49)$^{a}$ | (67,48 ± 0,51)$^{c}$ | (17,31 ± 0,66)$^{a}$ | (61,83 ± 0,33)$^{c}$ |
| Lun | 1 | 3 | (183,36 ± 0,49)$^{d}$ | (134,35 ± 0,51)$^{g}$ | (106,97 ± 0,66)$^{c}$ | (96,35 ± 0,33)$^{f,g}$ |
| Lun | 2 | 3 | (220,05 ± 0,49)$^{f}$ | (128,49 ± 0,51)$^{f}$ | (127,74 ± 0,66)$^{d}$ | (90,54± 0,33)$^{e}$ |
| Lun | 3 | 3 | (241,90 ± 0,49)$^{g}$ | (62,03 ± 0,51)$^{b}$ | (169,25 ± 0,66)$^{h}$ | (34,11 ± 0,33)$^{a}$ |
| Hvar | 1 | 3 | (457,24 ± 0,49)$^{l}$ | (166,72 ± 0,51)$^{i}$ | (371,38 ± 0,66)$^{l}$ | (129,71 ± 0,33)$^{j}$ |
| Hvar | 2 | 3 | (352,84 ± 0,49)$^{j}$ | (183,72 ± 0,51)$^{k}$ | (324,10 ± 0,66)$^{k}$ | (155,43 ± 0,33)$^{k}$ |
| Hvar | 3 | 3 | (267,15 ± 0,49)$^{h}$ | (103,14 ± 0,51)$^{d}$ | (180,64 ± 0,66)$^{i}$ | (68,48 ± 0,33)$^{d}$ |
| Vela Luka | 1 | 3 | (416,85 ± 0,49)$^{k}$ | (155,00 ± 0,51)$^{h}$ | (309,60 ± 0,66)$^{j}$ | (103,57 ± 0,33)$^{h}$ |
| Vela Luka | 2 | 3 | (177,11 ± 0,49)$^{c}$ | (177,73 ± 0,51)$^{j}$ | (157,64 ± 0,66)$^{g}$ | (118,91 ± 0,33)$^{i}$ |
| Vela Luka | 3 | 3 | (172,95 ± 0,49)$^{b}$ | (57,88 ± 0,51)$^{a}$ | (151,22 ± 0,66)$^{f}$ | (46,10 ± 0,33)$^{b}$ |

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Prema Tukey's HSD testu ista slova unutar stupca nisu statistički različita kod p<0,01. *Statistički značajan faktor kod 99% pouzdanosti

N – broj ponavljanja; UFK – ukupne fenolne kiseline; UFG – ukupni flavonol glikozidi

A1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

Prema rezultatima statističke analize prikazanim u *Tablicama 15* i *16*, pojedinačni utjecaj otapala, lokacije rasta i fenološke faze biljke, te kombinirani utjecaj lokacije rasta i fenološke faze biljke, imaju značajan utjecaj na kvantificirane masene udjele UFK i UFG u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje ($p<0,01$).

U ovisnosti o lokaciji, najveće vrijednosti masenih koncentracija UFK i UFG su određene u ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka ubranim sa lokacije Hvar (325,56 ± 0,24 mg/L odnosno 134,53 ± 0,17 mg/L), a najmanje u ekstraktima lista tršlje dobivenim iz uzoraka ubranima sa lokacije Barbariga (143,22 ± 0,24 mg/L, odnosno 100,41 ± 0,17 mg/L).

Osim navedenih pojedinačnih utjecaja vrste otapala i lokacije, fenološka faza je također imala utjecaj na masene koncentracije UFK i UFG. Najveće masene koncentracije UFK su određene tijekom FF 1 (284,03 ± 0,21 mg/L), a UFG tijekom FF 2 (143,92 ± 0,15 mg/L).

Rezultati statističke analize kombiniranog utjecaja lokacije i fenološke faze (*Tablica 16*) na metanolne i etanolne ekstrakte lista tršlje su pokazali da nema statistički značajnije razlike u masenim koncentracijama UFG u metanolnim ekstraktima lista tršlje tijekom FF 2 u ekstraktima dobivenim iz uzoraka ubranim sa lokacija Barbariga (177,29 ± 0,51 mg/L) i Vela Luka (177,73 ± 0,51 mg/L) te u etanolnim ekstraktima lista tršlje tijekom FF 1 dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (67,91 ± 0,33 mg/L) i FF 3 s lokacije Hvar (68,48 ± 0,33 mg/L).

## 4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije BAM iz listova tršlje primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE)

Za utvrđivanje optimalnih uvjeta izolacije fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima iz lista tršlje, ekstrakcija je provedena prema eksperimentalnom dizajnu prikazanim u *Tablici 5* čiji su rezultati prikazani u *Tablici 17*.

***Tablica 17***. Maseni udjeli fenolnih spojeva dobiveni ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje

| Uzorak | Temperatura (°C) | Snaga (W) | Vrijeme (min) | φ(metanol)=80 % | | | | φ(etanol)=80 % | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | UF (mg GAE/g) | UFL (mg QE/g) | UFLAV (mg QE/g) | HCK (mg KAF/g) | UF (mg GAE/g) | UFL (mg QE/g) | UFLAV (mg QE/g) | HCK (mg KAF/g) |
| **1** | 50 | 200 | 4 | 90,48 ± 0,05 | 31,86 ± 0,06 | 4,10 ± 0,05 | 13,54 ± 0,06 | 93,17 ± 0,09 | 33,70 ± 0,16 | 4,30 ± 0,05 | 13,22 ± 0,07 |
| **2** | 50 | 200 | 12 | 98,59 ± 0,03 | 38,57 ± 0,08 | 4,79 ± 0,07 | 15,58 ± 0,07 | 106,15 ± 0,10 | 40,54 ± 0,15 | 4,70 ± 0,06 | 15,52 ± 0,06 |
| **3** | 50 | 500 | 4 | 89,60 ± 0,07 | 30,15 ± 0,06 | 3,93 ± 0,04 | 12,25 ± 0,07 | 93,17 ± 0,07 | 32,21 ± 0,10 | 3,90 ± 0,05 | 12,30 ± 0,07 |
| **4** | 50 | 500 | 12 | 101,65 ± 0,13 | 36,57 ± 0,07 | 3,60 ± 0,06 | 12,89 ± 0,09 | 102,07 ± 0,05 | 38,73 ± 0,16 | 3,84 ± 0,05 | 12,62 ± 0,06 |
| **5** | 70 | 200 | 4 | 82,49 ± 0,08 | 29,87 ± 0,05 | 3,10 ± 0,08 | 13,15 ± 0,09 | 87,19 ± 0,10 | 31,68 ± 0,16 | 3,24 ± 0,05 | 12,69 ± 0,34 |
| **6** | 70 | 200 | 12 | 95,18 ± 0,06 | 34,52 ± 0,05 | 4,11 ± 0,09 | 13,07 ± 0,07 | 98,49 ± 0,05 | 37,57 ± 0,14 | 3,93 ± 0,07 | 12,86 ± 0,53 |
| **7** | 70 | 500 | 4 | 79,43 ± 0,06 | 27,93 ± 0,04 | 3,08 ± 0,04 | 12,10 ± 0,05 | 83,30 ± 0,04 | 30,38 ± 0,15 | 3,00 ± 0,05 | 11,92 ± 0,03 |
| **8** | 70 | 500 | 12 | 106,79 ± 0,05 | 40,60 ± 0,09 | 3,91 ± 0,04 | 14,60 ± 0,05 | 111,26 ± 0,11 | 41,22 ± 0,15 | 4,11 ± 0,07 | 14,54 ± 0,05 |
| **9** | 43 | 350 | 8 | 84,31 ± 0,05 | 28,57 ± 0,06 | 2,90 ± 0,07 | 12,68 ± 0,06 | 88,45 ± 0,10 | 31,20 ± 0,15 | 3,12 ± 0,05 | 12,92 ± 0,07 |
| **10** | 77 | 350 | 8 | 103,50 ± 0,05 | 40,10 ± 0,08 | 3,50 ± 0,06 | 12,11 ± 0,07 | 109,65 ± 0,08 | 39,84 ± 0,09 | 3,87 ± 0,03 | 12,34 ± 0,08 |
| **11** | 60 | 98 | 8 | 90,71 ± 0,04 | 35,18 ± 0,07 | 3,11 ± 0,07 | 13,11 ± 0,07 | 94,35 ± 0,09 | 36,73 ± 0,13 | 3,25 ± 0,06 | 12,81 ± 0,06 |
| **12** | 60 | 602 | 8 | 103,24 ± 0,07 | 38,24 ± 0,04 | 4,18 ± 0,06 | 14,17 ± 0,05 | 108,07 ± 0,07 | 39,77 ± 0,11 | 4,04 ± 0,07 | 13,84 ± 0,05 |
| **13** | 60 | 350 | 1 | 61,32 ± 0,05 | 25,59 ± 0,08 | 2,12 ± 0,05 | 11,11 ± 0,05 | 68,44 ± 0,08 | 25,48 ± 0,09 | 2,31 ± 0,05 | 11,27 ± 0,06 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **14** | 60 | 350 | 15 | 91,58 ± 0,03 | 36,18 ± 0,09 | 3,15 ± 0,05 | 13,34 ± 0,05 | 94,06 ± 0,04 | 36,20 ± 0,15 | 3,40 ± 0,06 | 13,59 ± 0,04 |
| **15 (K)** | 60 | 350 | 8 | 90,80 ± 0,06 | 33,48 ± 0,07 | 3,30 ± 0,06 | 14,24 ± 0,07 | 94,86 ± 0,09 | 35,89 ± 0,06 | 3,55 ± 0,05 | 13,91 ± 0,04 |
| **16 (K)** | 60 | 350 | 8 | 89,91 ± 0,06 | 32,25 ± 0,08 | 3,24 ± 0,06 | 13,39 ± 0,06 | 93,12 ± 0,08 | 34,39 ± 0,15 | 3,28 ± 0,06 | 13,67 ± 0,05 |

Vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje dobivenim primjenom MAE korištenjem 80 % - tne vodene otopine metanola kao otapala su iznosile od 61,32 ± 0,05 do 106,79 ± 0,05 mg GAE/g, ukupnih flavonoida od 25,59 ± 0,08 do 40,60 ± 0,09 mg QE/g, ukupnih flavonola od 2,12 ± 0,05 do 4,79 mg QE/g te ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 11,111 ± 0,05 do 15,58 ± 0,07 mg KAF/g. Primjenom 80 % vodene otopine etanola maseni udjeli kvantificirani za ukupne fenole su iznosili od 68,44 ± 0,08 do 111,26 ± 0,11 mg GAE/g, ukupne flavonoide 25,48 ± 0,09 do 41,22 ± 0,15 mg QE/g, ukupne flavonole od 2,31 ± 0,05 do 4,70 ± 0,06 mg QE/g te ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 11,27 ± 0,06 do 15,52 ± 0,06 mg KAF/g.

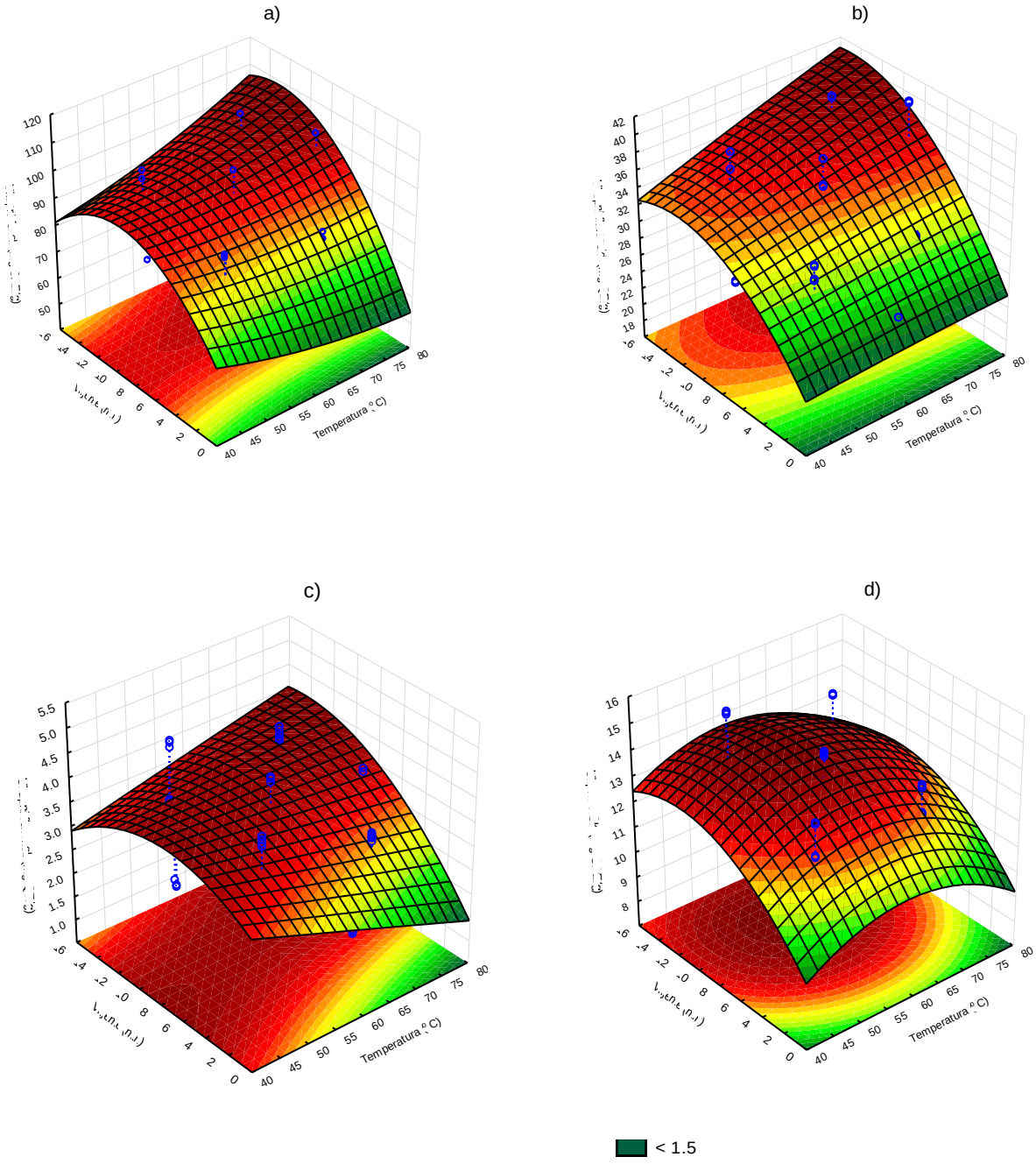
Najveća vrijednost masenih udjela određenih u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje ukupnih fenola 111,26 ± 0,011 mg GAE/g i ukupnih flavonoida 41,22 ± 0,15 mg GAE/g određena je u uzorku 8 čiji ciklus je trajao 12 min pri temperaturi od 70 °C i snazi mikrovalova od 500 W, te ukupnih flavonola 4,79 ± 0,07 mg QE/g i ukupnih hidroksicimetnih kiselina 15,58 ± 0,07 mg KAF/g u uzorku broj 2 pri temperaturi od 50 °C tijekom 12 minuta uz snagu mikrovalova od 200 W.

Najniže vrijednosti masenih udjela svih promatranih fenolnih spojeva su određene u uzorku broj 13 pri temperaturi od 60 °C, trajanju ciklusa od 1 min i pri snazi mikrovalova od 350 W.
Nadalje, iz rezultata prikazanih u *Tablici 17* je vidljivo da su dobivene slične vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola povećanjem snage mikrovalova s 98 W uzorak broj 11 (90,71 ± 0,04 mg GAE/g) na 350 W uzorak broj 15 (K) (90,80 ± 0,06 mg GAE/g) pri istim vrijednostima temperature (60 °C) i vremena ekstrakcije (8 min).

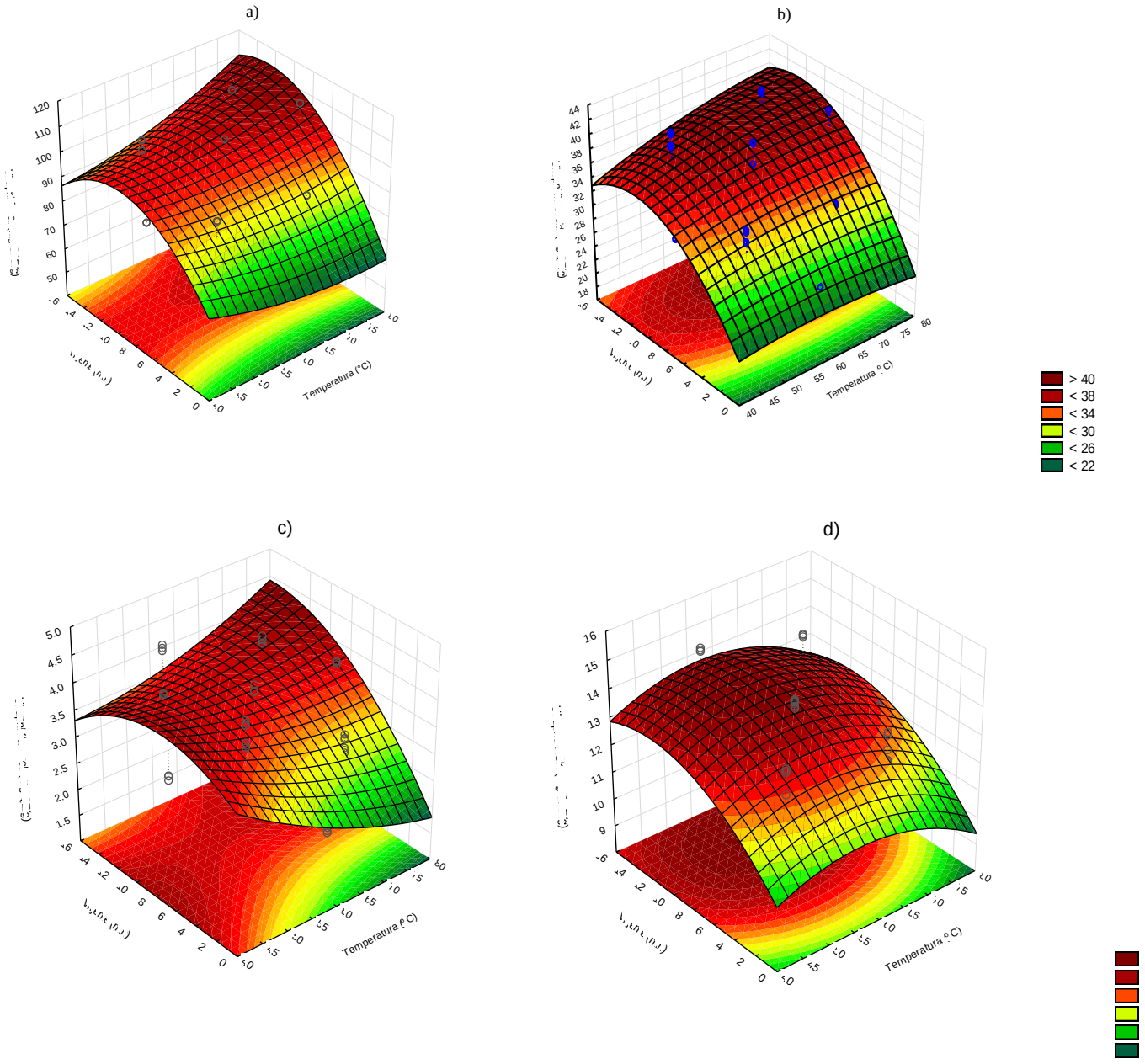
Najveće vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola i ukupnih flavonoida su u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje određeni u uzorku broj 8 uz trajanje ciklusa od 12 min pri temepraturi od 70 °C te snagu mikrovalova od 500 W, a ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina u uzorku broj 2 uz trajanje ciklusa od 12 min pri temepraturi od 50 °C te uz snagu mikrovalova od 200 W. Najmanje vrijednosti masenih udjela svih promatranih fenolnih spojeva u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje su određeni u uzorku broj 13 pri temperaturi od 60 °C, trajanju ciklusa od 1 min i pri snazi mikrovalova od 350 W.

Prilikom povećanja snage mikrovalova s 98 W na 350 W, uočene su slične vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola uzoraka 11 i 15 (K) u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje, pri temperaturi od 60 °C i trajanju ciklusa od 12 min.

Prema određenim masenim udjelima svih promatranih fenolnih skupina u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje, a koji su prikazani u *Tablici 17*, može se zaključiti da sa porastom vremena ekstrakcije, dolazi do rasta njihovih masenih udjela.




***Slika 25.*** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola (a), ukupnih flavonoida (b), ukupnih flavonola (c) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (d) u 80 %-tnom metanolnom ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije




***Slika 26.*** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola (a), ukupnih flavonoida (b), ukupnih flavonola (c) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (d) u 80 %-tnom etanolnom ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije

Na *Slikama 25* i *26* prikazan je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola (mg GAE/g) (a), ukupnih flavonoida (mg QE/g) (b), ukupnih flavonola (mg QE/g)

(c) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg KAF/g) (d) u 80 %-tnim metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje dobivenim pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W) u ovisnosti o vremenu ekstrakcije i temperaturi. Iz trodimenzionalnog prikaza odzivnih površina vidljivo je da vrijeme ekstrakcije ima ključan utjecaj na maseni udio svih grupa bioaktivnih spojeva u oba otapala, odnosno povećanjem vremena ekstrakcije dovelo je do povećanja masenog udjela ukupnih fenola (a), ukupnih flavonoida (b), ukupnih flavonola (c) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (d). Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina u skladu je rezultatima ANOVE gdje je vrijeme ekstrakcije ima signifikantan utjecaj na maseni udjel ukupnih fenola tj. povećanje vremena ekstrakcije rezultira većim masenim udjelom ukupnih fenola.

### 4.2.1. Utjecaj procesnih parametara na prinos fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

***Utjecaj vremena ekstrakcije***

Vrijeme ekstrakcije signifikantno ($p \leq 0,05$) je utjecalo na učinkovitost ekstrakcije svih promatranih skupina fenolnih spojeva iz metanolnih i etanolnih ekstrakata lista tršlje. Rezultati ukazuju da povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do povećanja ekstrakcijskih prinosa. Najviši maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina iz metanolnih i etanolnih ekstrakta lista tršlje dobivene su provedbom ekstrakcije u trajanju od 12 minuta, dok su najniži maseni udjeli svih promatranih skupina fenolnih spojeva dobivena u najkraćim trajanjem ekstrakcije od 1 minute. Vrijednosti najviših masenih udjela ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina su iznosile za metanolni ekstrakt 106,79 mg GAE/g, 40,60 mg QE/g, 4,79 mg QE/g i 15,58 mg KAF/g, te za etanolni ekstrakt 111,26 mg GAE/g, 41,22 mg QE/g, 4,70 mg QE/g i 15,52 mg KAF/g. Daljnjim povećanjem vremena na 15 min masni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina se smanjuju na 91,528 mg GAE/g, 36,15 mg QE/g, 3,15 mg QE/g i 13,34 mg KAF/g u metanolnom ekstraktu, te 94,06 mg GAE/g, 36,20 mg QE/g, 3,40 mg QE/g i 13,59 mg KAF/g u etanolnom ekstraktu.

Dobiveni rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima i literaturnim navodima. Rafiee i sur., (2011) istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (2 - 15 min) na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz lišća triju varijeteta maslina te su zaključili da s porastom vremena ekstrakcije raste i udio fenolnih spojeva što je u skladu s ovim istraživanjem.

Rezultati istraživanja Jafari i sur., (2011) su u skladu s rezultatima ovog istraživanja kada je najveći prinos dobiven ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima u trajanju od 12 minuta, a daljnje povećanje vremena je imalo za posljedicu i smanjenje prinosa ekstrakcije. U istraživanju koje su proveli Dragović – Uzelac i sur. (2012) određivanja optimalnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) varirali su vrijeme ekstrakcije potpomognute mikrovalovima od 3 do 11 minuta i zaključili kako je ekstrakcijski prinos bio najučinkovitiji pri 9 minuta. Utjecaj vremena, otapala, temperature i snage mikrovalova MAE na fenolne spojeve iz cvijeta trnine istraživali su Lovrić i sur. (2017) čiji su rezultati pokazali da je produljenjem vremena ekstrakcije značajno povećana količina ukupnih fenola odnosno povećanjem vremena (15 – 25 minuta) dobiveni su veći prinosi ukupnih fenola. S druge strane, produljenje vremena ekstrakcije od 5 do 25 minuta nije imao signifikantan utjecaj na ukupne flavonole. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je ograničena na izolaciju malih molekula fenolnih spojeva kao što su fenolne kiseline (galna i elaginska kiselina), kvercetin, izoflavin i *trans*-resveratrol iz razloga što su takve molekule stabilne pod zračenjem mikrovalova do 100 °C tijekom 20 min (Panzella i sur., 2020). Dodatni ciklusi MAE imaju za posljedicu pad u prinosima fenolnih spojeva i flavanoida koji je uzrokovan oksidacijom spojeva (Panzella i sur., 2020).

***Utjecaj temperature ekstrakcije***

Temperatura kao procesni parametar na prinos ekstrakcije nije značajno utjecala na masene udjele ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje. Korištene temperature u ovom istraživanju su bile u rasponu 43-77 °C, s najvećim masenim udjelima ukupnih fenola i flavonoida postignutim ekstrakcijom pri temperaturi od 70 °C, a ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina pri temperaturi od 50 °C. Ekstrakcijama pri temepraturama od 50 – 70 °C, maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida pokazuju trend povećanja, dok pri temepraturi ekstrakcije od 77 °C dolazi do opadanja njihovih masenih udjela koja je uzrokovana degradacijom spojeva.

U slučaju ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina, vidljiv je trend povećanja masenih udjela sa 43 °C na 50 °C. Lafka i sur., (2017) u svom istraživanju su zaključili kako porast temperature ekstrakcije iznad 60 °C rezultira smanjenjem ukupnih fenola iz komine grožđa.

***Utjecaj snage mikrovalova***

Pri provedbi ekstrakcije potpomognute mikrovalovima primjenjivala se snaga mikrovalova u rasponu od 98 - 602 W, a najveći maseni udjeli ukupnih fenola u obje vrste otapala postignuta je pri korištenoj snaga od 500 W, pri temperaturi od 70 °C i vremenu od 12 minuta i iznosila je 106,78 u metanolnim i 111,26 u etanolnim i mg GAE/g ekstraktima. Isti procesni parametri su se pokazali najbolji i u ekstrakciji ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima (14,60 mg QE/g) dok su za istu skupinu BAM-a u etanolnim ekstraktima bolji procesni parametri bili: 77 °C, 350 W i 8 minuta. Najveći maseni udjeli ukupnih flavonola u obje vrste ekstrakata dobiveni su kada je MAE provedena pri 50 °C, 200 W i vremenu ekstrakcije 12 minuta, što se ujedno pokazalo kao najbolji procesni parametri za ekstrakciju HCK kada se kao otpalo koristi 80 %-tni etanol. Dobiveni rezultati su pokazali da snaga kao procesni parametar nije imao signifikantan utjecaj na prinos ekstrakcije ($p \leq 0,05$). U ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima snaga i temperatura su međusobno povezane na način da povećanjem snage povećava se temperatura ekstrakcijskog postupka, tako da previsoka snaga može prouzročiti termičku degradaciju bioaktivnih spojeva. Song i sur., (2011) provodili su ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima na lišću slatkog krumpira pri čemu su varirali snagu od 150 - 550 W. Ekstrakcijski prinos se proporcionalno povećavao kako se povećavala snaga mikrovalova do 350 W. Pri daljnjim povećanjem snage mikrovalova došlo je do pada u prinosu ukupnih fenola.

***Tablica 18.*** Jednadžba regresijskog modela i koeficijent determinacije za koncentraciju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u 80 %-tnim etanolnim ekstraktima lista tršlje

| Varijabla | Model | $R^2$ |
|---|---|---|
| **Ukupni fenoli (Y)** | $Y=98,7528 - 5,5809X_1 - 1,2565X_1^2 - 11,2835X_2 – 1,8984X_2^2 + 4,4610X_3 + 8,5020X_3^2 + 15,1346X_1X_2 – 12,4311X_1X_3 – 18,7632X_2X_3$ | 0,45 |
| **Ukupni flavonoidi (Y)** | $Y=35,75815 – 1,93650X_1 + 0,24539X_1^2 – 7,97948X_2 – 1,567X_2^2 + 4,12138X_3 + 5,61893X_3^2 + 7,99176X_1X_2 – 8,00689X_1X_3 – 8,77322X_2X_3$ | 0,53 |
| **Ukupni flavonoli (Y)** | $Y=3,317217 + 0,110434X_1 - 0,129987X_1^2 – 0,952090X_2 – 0,134092X_2^2 – 0,199250X_3 + 0,054427X_3^2 + 0,985802X_1X_2 + 0,014074X_1X_3 – 0,949228X_2X_3$ | 0,63 |

| | | |
|---|---|---|
| **Ukupne HCK (Y)** | $Y=12,65306 – 0,4986X_1 + 0,51075X_1^2 – 2,50265X_2 – 0,61045X_2^2 + 1,89513X_3 + 1,91289X_3^2 + 2,03257X_1X_2 – 2,84188X_1X_3 – 1,44269X_2X_3$ | 0,51 |

***Tablica 19.*** Jednadžba regresijskog modela i koeficijent determinacije za koncentraciju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u 80 %-tnim metanolnim ekstraktima lista tršlje

| Varijabla | Model | $R^2$ |
|---|---|---|
| **Ukupni fenoli (Y)** | $Y=94,8562 - 11,7064X_1 + 1,7839X_1^2 - 6,2287X_2 – 0,3387X_2^2 + 8,6618X_3 + 11,2995X_3^2 + 10,8103X_1X_2 – 17,0613X_1X_3 – 15,9384X_2X_3$ | 0,42 |
| **Ukupni flavonoidi (Y)** | $Y=34,53663 + 0,29131X_1 – 1,24623X_1^2 – 8,59164X_2 – 3,15003X_2^2 + 4,03305X_3 + 3,98738X_3^2 + 9,97380X_1X_2 – 5,33645X_1X_3 – 7,96337X_2X_3$ | 0,44 |
| **Ukupni flavonoli (Y)** | $Y=2,98026 + 0,30759X_1 - 0,13017X_1^2 – 1,29044X_2 + 0,24300X_2^2 – 0,79452X_3 + 0,21745X_3^2 + 0,92835X_1X_2 + 0,10909X_1X_3 – 1,81995X_2X_3$ | 0,76 |
| **Ukupne HCK (Y)** | $Y=12,53361 – 0,77946X_1 + 0,75297X_1^2 – 2,23517X_2 – 0,49748X_2^2 + 2,10125X_3 + 2,17845X_3^2 + 1,91995X_1X_2 – 3,37758X_1X_3 – 1,09738X_2X_3$ | 0,58 |

U *Tablicama 18* i *19* prikazane su jednadžbe regresijskog modela i pripadajući koeficijent determinacije za masene udjele ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u 80 %-tnim etanolnim i metanolnim ekstraktima lista tršlje. Jednadžba regresijskog modela omogućava predviđanje masenih udjela ukupnih fenola za svaku vrijednost temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije. Pripadajući koeficijent determinacije ($R^2$) pokazuje kolika je preciznost modela za predviđanje ukupnih fenola. Vrijednost koeficijenta determinacije za ukupne flavonole (0,63) u etanolnim ekstraktima ukazuje na dobro prilagođen model, dok je taj model za istu skupinu spojeva u metanolnim ekstraktima još bolji (0,76).

***Tablica 20.*** Optimalni parametri za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima lista tršlje s predviđenim i dobivenim masenim udjelima ukupnih fenola te dobivenim masenim udjelima ukupnih fenola postupkom konvencionalne ekstrakcije

| **Ekstrakcijsko otapalo** | | | **Ukupni fenoli (mg GAE/g)** | | **Ukupni flavonoidi (mg QE/g)** | | **Ukupni flavonoli (mg QE/g)** | | **Ukupne HCK (mg KAF/g)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Optimalni parametri MAE** | | **P** | **D** | **P** | **D** | **P** | **D** | **P** | **D*** |
| **φ(etanol)=80 %** | Temperatura | 43 °C | 107,74 | 101,6 | 40,38 | 38,26 | 4,92 | 4,43 | 15,01 | 14,28 |
| | Snaga mikrovalova | 98 W | | | | | | | | |
| | Vrijeme | 10 minuta | | | | | | | | |
| | **Uvjeti konvencionalne ekstrakcije** | | | | | | | | | |
| | Vrijeme | 90 minuta | - | 70,52 | - | 23,63 | - | 2,12 | - | 2,29 |
| **φ(metanol)=80 %** | Temperatura | 76 °C | 124,24 | 110,57 | 47,56 | 41,36 | 4,84 | 4,26 | 14,58 | 12,81 |
| | Snaga mikrovalova | 602 W | | | | | | | | |
| | Vrijeme | 12 minuta | | | | | | | | |
| | **Uvjeti konvencionalne ekstrakcije** | | | | | | | | | |
| | Vrijeme | 90 minuta | - | 90,73 | - | 33,90 | - | 3,22 | - | 1,47 |

*P=predviđeni maseni udjeli BAM,
D=dobiveni maseni udjeli BAM

U *Tablici 20* prikazani su optimalni parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u 80 %-tnim etanolnim i metanolnim ekstraktima iz lista tršlje. Vrijeme od 10 minuta, temperatura 43 °C i snaga 98 W su optimalni parametri kojima se postiže najveći maseni udjeli ukupnih fenola,

ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi 80 %-tni etanol. Uvrštavanjem u dobiveni regresijski model dobiva se predviđeni maseni udjel ukupnih fenola 107,47 mg GAE/g, ukupnih flavonoida 40,38 mg QE/g, ukupnih flavonola 4,92 mg QE/g i ukupnih HCK 15,01 mg KAF/g. Provedbom ekstrakcije pri optimalnim uvjetima dobiveni su eksperimentalni maseni udjeli svih promatranih BAM koji su u skladu s vrijednostima predviđenim modelom. U etanolnim ekstraktima lista tršlje, postoci dobivenog masenog udjela UFK, UFL i HCK su u prosjeku manji za 5 % odnosno u slučaju HCK za 10 % od predviđenih masenih udjela.

Kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristio 80 % metanol optimalni uvjeti mikrovalne ekstrakcije pri kojima se postižu najveći maseni udjeli BAM-a su pri temperaturi 76 °C, snazi mikrovalova 602 W i vremenu ekstrakcije 12 minuta. Provedbom eksperimenta pri tim uvjetima dobiveni su maseni udjeli svih BAM sukladno predviđenom modelu, ali u nešto nižem postotku (u prosjeku 90 %) u odnosu na etanolne ekstrakte gdje su maseni udjeli BAM-a dobiveni eksperimentom pri optimalnim uvjetima bili u prosjeku oko 95 % izračunate vrijednosti.

Također, provedena je konvencionalna ekstrakcija ukupnih fenola iz lista tršlje postupkom maceracije potpomognute tresenjem u trajanju od 90 minuta. Maseni udjeli svih BAM-a u obje vrste ekstrakcijskih otapala su bili manji u odnosnu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima. Usporedbom dobivenih rezultata vidljivo je da su maseni udjeli BAM-a u etanolnim ekstraktima dobivenim konvencionalnom ekstrakcijom bili od 16 % (HCK) do 70 % (ukupni fenoli) vrijednosti dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE. Te vrijednosti su više u metanolnim ekstraktima u kojima maseni udjeli variraju od 12 % (HCK) do 82 % (ukupni fenoli i ukupni flavonoidi) masenih udjela BAM u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE.

Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima budući da je najveća prednost novih ekstrakcijskih tehnika među kojima je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima bitno skraćivanje vremena potrebno za izolaciju BAM iz biljnih materijala.

Istraživanjem koje su proveli Pan i sur., (2003) istražili su utjecaj različitih ekstrakcijskih tehnika (ekstrakcija pri sobnoj temperaturi (20 h), ekstrakcija pod refluksom tijekom 45 minuta, MAE (0,5-8 minuta) i ekstrakcija potpomogunta ultrazvukom tijekom 90 minuta na izolaciju polifenola iz listova zelenog čaja. Dobiveni rezultati su pokazali kako se MAE pokazala kao najučinkovitija metoda za ekstrakciju polifenola iz listova zelenog čaja u kojoj su tijekom 4 minute dobiveni najveći prinosi ukupnih polifenola u odnosu na ostale metode kod kojih je bilo dulje vrijeme

ekstrakcije. Nadalje, Dragović – Uzelac i sur., (2012) su dokazali da je izolacija polifenola iz listova kadulje znatno kraća kod MAE u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom. Oba tipa ekstrakcije su provedena pri istim temperaturama (80 °C) i dobiveni rezultati su pokazali da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u trajanju od 9 min dala veće koncentracije ukupnih fenola nego konvencionalna ekstrakcija u trajanju od 30 min.

Maseni udjeli antocijana i fenolnih kiselina iz višnje Maraske (*Prunus cerasus var. Marasca)* dobiveni ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (50 - 70 °C, 5 - 12 min, snaga mikrovalova 250 - 500 W) i konvencionalnom ekstrakcijom u trajanju od 20 min su pokazali da su ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima su dobiveni veći prinosi ukupnih fenola nego konvencionalnom ekstrakcijom (Elez Garofulić i sur., 2013).

Nakon što je provedeno optimiranje postupka ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom MAE, u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima provedena je UPLC-MS/MS analiza, s ciljem utvrđivanja i onih fenolnih spojeva čije koncentracije su bile preniske da bi se odredile primjenom HPLC analize. Primjena UPLC-MS/MS analize pokazala se kao izvrsna nadogradnja budući je identificiran znatno veći broj fenolnih spojeva i dobivena sveobuhvatna slika sastava fenolnih spojeva u listovima tršlje.

***Tablica 21.*** Identificirani i kvantificirani fenolni spojevi iz metanolnih i etanolnih ekstrakta lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

| Spoj | Retencijsko vrijeme (min) | Prekursor ion (m/z) | Fragment ion (m/z) | Metanolni ekstrakt (mg/100 g) | Etanolni ekstrakt (mg/100 g) | Identifikacija |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0,905 | 367 | 193 | 1,88 | 2,30 | 3-*O*-feruloilkina kiselina |
| **2** | 0,916 | 337 | 173 | 0,16 | 0,20 | 4-*p*-kumaroilkina kiselina |
| **3** | 0,918 | 353 | 191 | 0,41 | 0,50 | 3-*O*-kafeoilkina kiselina |
| **4** | 0,979 | 331 | 169 | 15,41 | 18,80 | monogaloil glukoza |
| **5** | 1,313 | 169 | 125 | 3,60 | 4,40 | galna kiselina* |
| **6** | 2,144 | 343 | 191 | 2,54 | 3,10 | 5-*O*-galoilkina kiselina |
| **7** | 2,639 | 353 | 191 | 0,25 | 0,30 | klorogenska kiselina* |
| **8** | 3,251 | 495 | 343 | 496,92 | 606,00 | digaloilkina kiselina |
| **9** | 3,346 | 579 | 427 | 11,15 | 13,60 | procijanidin B1* |
| **10** | 3,468 | 579 | 427 | 8,51 | 10,70 | procijanidin B2* |
| **11** | 3,602 | 337 | 163 | 0,32 | 0,40 | 3-*p*-kumaroilkina kiselina |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **12** | 3,935 | 291 | 139 | 26,11 | 31,65 | epikatehin* |
| **13** | 3,944 | 291 | 139 | 25,99 | 31,70 | katehin* |
| **14** | 5,171 | 459 | 139 | 8,52 | 9,20 | epigalokatehin galat* |
| **15** | 5,208 | 647 | 495 | 91,26 | 102,10 | trigaloilkina kiselina |
| **16** | 5,836 | 627 | 319 | 433,69 | 528,90 | miricetin-rutinozid |
| **17** | 5,992 | 495 | 319 | 246,12 | 300,00 | miricetin-glukuronid |
| **18** | 5,992 | 319 | 273 | 250,22 | 304,10 | miricetin* |
| **19** | 6,549 | 611 | 303 | 26,67 | 31,90 | kvercetin-3-rutinozid |
| **20** | 6,665 | 465 | 319 | 1461,57 | 1782,4 | miricetin-ramnozid |
| **21** | 6,77 | 442,9 | 139 | 1,23 | 1,50 | epikatehin galat* |
| **22** | 6,886 | 465 | 303,1 | 31,47 | 39,40 | kvercetin-3-glukozid* |
| **23** | 6,946 | 449 | 287 | 15,22 | 19,50 | kamferol-3-glukozid |
| **24** | 7,309 | 595 | 287 | 2,05 | 2,50 | kamferol-ramnozil-heksozid |
| **25** | 7,312 | 595 | 287 | 1,95 | 2,40 | kamferol-3-rutinozid* |
| **26** | 7,342 | 435 | 303 | 8,40 | 10,7 | kvercetin-pentozid |
| **27** | 7,452 | 581 | 287 | 0,16 | 0,20 | kamferol-pentozil-heksozid |
| **28** | 7,702 | 449 | 303 | 107,33 | 130,90 | kvercetin-ramnozid |
| **29** | 8,373 | 419 | 287 | 1,80 | 2,20 | kamferol-pentozid |
| **30** | 8,585 | 433 | 287 | 9,30 | 11,30 | kamferol-ramnozid |
| **31** | 9,989 | 287 | 153 | 21,81 | 26,60 | luteolin* |
| **32** | 11,162 | 637 | 287 | 0,17 | 0,20 | kamferol-acetil-rutinozid |
| **33** | 11,185 | 271 | 153 | 1,64 | 2,00 | apigenin* |

U listu tršlje određen je veliki broj strukturno različitih spojeva koji se mogu svrstati u 5 grupa: hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavanoli, flavonol glikozidi i flavoni. Neovisno o upotrijebljenom otapalu (metanol ili etanol) pri ekstrakciji, određene su iste skupine spojeva.

Iz grupe ***hidroksibenzojevih kiselina*** najzastupljenije su: galna kiselina, monogaloil glukoza, 5-*O*-galoilkina kiselina, trigaloilkina kiselina, digaloilkina kiselina, a iz grupe ***hidroksicimetnih kiselina*** 4-*p*-kumaroilkina kiselina, 3-*p*-kumaroilkina kiselina, klorogenska kiselina, 3-*O*-kafeoilkina kiselina, 3-*O*-feruloilkina kiselina.

Veliki broj spojeva identificiranih u listu tršlje pripada skupini flavonoida što je izuzetno važno budući da spojevi iz ove skupine najčešće pokazuju izražena bioaktivna svojstva. Tri najznačajnije grupe flavonoida lista tršlje pripadaju podskupinama flavanola, flavonol glikozida i flavona. Najzastupljeniji ***flavanoli*** su katehin, procijanidin B2, procijanidin B1, epikatehin, epigalokatehingalat, epikatehingalat, iz podskupine ***flavonol glikozida*** su: miricetin, miricetin-rutinozid, miricetin-glukuronid, miricetin-ramnozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol-3-glukozid, kamferol-ramnozil-heksozid, kamferol-pentozil-heksozid, kamferol-pentozid, kamferol ramnozid, kamferol-acetil-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-pentozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-3-rutinozid, dok apigenin i luteonin su nazastupljeniji ***flavoni.***

U metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje u najvećim masenim udjelima kvantificirani su spojevi iz grupe flavonol glikozida, a dominiraju glikozidi kamferola, kvercetina i miricetina. U ekstraktima koji su dobiveni primjenom 80 % -tnog metanola i 80 % -tnog etanola u najvećem masenom udjelu određen je miricetin-ramnozid, i to u vrijednosti od 1461,57 mg/100 g uzorka odnosno 1782,4 mg/100 g uzorka. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodno provedenom istraživanju u kojem je određeno da se u listu *Pistacia lentiscus* L. od ukupnog sadržaja fenola gotovo 20 % odnosi se na derivate miricetina (Bozorgi i sur., 2013).

Spoj **1** identificiran je kao 3-*O*-feruloilkina kiselina, a kvantificiran je prema referentnom standardu ferulinske kiseline koji ima prekursor ion *m/z* 367, a fragment ion *m/z* 193. Nadalje, spoj **3** identificiran je kao 3-*O*-kafeoilkina kiselina, prema standardu klorogenske kiseline s prekursor ionom *m/z* 353 i fragment ionom *m/z* 191. Spojevi **2** i **11** kvantificirani su prema standardnoj krivulji *p*-kumarinske kiseline, te je utvrđeno da oba spoja imaju prekursor ion *m/z* 337. Spoj **2**, ima fragment ion *m/z* 173 što upućuje na zaključak da je riječ o 4-*p*-kumaroilkina kiselini, a spoj **11** koji sadrži fragment ion *m/z* 163 odgovara 3-*p*-kumaroilkina kiselini. Na temelju masenih fragmenata, spojevi **5** i **7** identificirani su usporedbom s referentnim standardima galne i klorogenske kiselina te su potvrđene pretpostavljene strukture, kao i da navedeni spojevi pripadaju grupi fenolnih kiselina. Spojevi **4**, **6**, **8** i **15** identificirani su kao derivati galne kiseline, a kvantitativne vrijednosti određene su prema standardnoj krivulji galne kiseline. Za spoj **4** utvrđeno je da ima prekursor ion *m/z* 331, te uslijed gubitka glukoze (-162 amu) nastaje fragment ion *m/z* 169, koji je karakterističan ali i istovremeno upućuje na strukturu monogaloil-glukoze. Nadalje, spoj **6** je identificiran kao 5-*O*-galoilkina kiselina, na što upućuje podatak o prekursor ionu *m/z* 343 i fragment ionu *m/z* 191 koji nastaje kao posljedica gubitka galoil jedinice (-152 amu). Spoj **8** s

prekursor ionom *m/z* 495 i fragment ionom *m/z* 343 kvantificiran je kao digaloilkina kiselina, dok je spoj **15** identificiran kao trigaloilkina kiselina s prekursor ionom *m/z* 647, te fragment ionom *m/z* 495 koji nastaje zbog gubitka galoil jedinice (-152 amu) (Wyrepkowski i sur., 2014).

Iz skupine fenolnih kiselina, u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje dominiraju galna kiselina i njeni derivati, a zajedno čine 70 % spojeva prisutnih u listu tršlje (Romani i sur., 2002). Vrijednosti masenih udjela galne kiseline u metanolnom i etanolnom ekstraktu lista tršlje su iznosili 3,60 mg/100 g uzorka i 4,4 mg/100 g uzorka, dok njen derivat digaloilkina kiselina je kvantificirana u masenom udjelu od 496,92 mg/100 g uzorka odnosno 606 mg/100 g uzorka. HPLC analizom ekstrakta lista tršlje, Romani i sur., (2002) zaključuju da 3,5-*O*-digaloilkina kiselina, pokazuje najveći maseni udio u iznosu od 2680 ± 467 mg/100 g suhe tvari ekstrakta. Usporedbom masenih udjela hidroksicimetnih i hidrokisbenzojevih kiselina u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje, maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina u obje vrste ektstrakta su se pokazali nižim (do 2,3 mg/100 g uzorka).

Svi spojevi iz skupine ***flavanola,*** koji su u *Tablici 21* prikazani kao spojevi **9**, **10**, **12**, **13**, **14** i **21**, identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao što su procijanidin B1, procijanidin B2, epikatehin, katehin, epigalokatehin-galat, epikatehin-galat. Navedeni spojevi su određeni i u metanolnom i etanolnom ekstraktu, a nešto veći maseni udjeli su određeni u ekstraktima lista tršlje dobivenim uz upotrebu etanola kao otapala. Od navedenih spojeva najzastupljeniji flavanoli u ekstraktu lista tršlje su katehin i epikatehin s time da je katehin određen u masenom udjelu od 25,99 mg/100 g u metanolnom ekstraktu lista tršlje i 31,7 mg/100 g uzorka u etanolnom ekstraktu lista tršlje, dok su maseni udjeli epikatehina bili 26,11 mg/100 g uzorka u metanolnom odnosno 31,65 mg/100 g uzorka u etanolnom ekstraktu lista tršlje. Maseni udjeli procijanidina B1 u metanolnom ekstraktu lista tršlje su iznosili 11,15 mg/100 g uzorka odnosno 13,60 mg/100 g uzorka u etanolnonm ekstraktu lista tršlje. Istraživanja koje su proveli Zitouni i sur., (2016) te Mehenni i sur., (2016) dokazuju prisustvo katehina listu tršlje s određenim vrijednostima masenih udjela od 4,106 mg/100 g suhe tvari i 31,79 ± 5,76 mg/g suhe tvari.

Spojevi **18**, **22** i **25,** koji pripadaju skupini ***flavonol glikozida***, su identificirani usporedbom s referentnim standardima kao što su miricetin, kvercetin-3-glukozid i kamferol-3-rutinozid, a rezultati usporedbe su pokazali da je miricetin s masnim udjelom od 250,22 mg/100 g odnosno 304,10 mg/100 g najzastupljeniji flavonol glikozid u metanolnim i etanolnim ekstraktima lista tršlje.

Spojevi **16**, **17**, **20,** okarakterizirani fragmentnim ionom *m/z* 319**,** identificirani su kao ***derivati miricetina.*** Spoj **16** ima prekursor ion *m/z* 627, a fragmentacijom odnosno uslijed gubitka ramnoze (-146 amu) i glukoze (-162 amu) nastaje fragmentni ion *m/z* 319 što odgovara strukturi miricetin-rutinozida (Osterc i sur., 2014). MS/MS spektar spoja **17** ima prekursor ion *m/z* 495, a gubitak glukuronilne jedinice (-176 amu) rezultira fragment ionom čiji je *m/z* 319 što nas navodi na zaključak da navedeni spoj ima strukturu miricetin-glukuronida (Carocho i sur., 2014).

Spoj **20** je miricetin-ramnozid koji je okarakteriziran prekursor ionom *m/z* 465 i fragmentnim ionom *m/*z 319 koji odgovara gubitku ramnoze (-146 amu). Od svih derivata miricetina, najveće masene udjele pokazuje miricetin-ramnozid u iznosima 1461,57 mg/100 g uzorka u metanolnom ekstraktu odnosno 1782,40 mg/100 g uzorka u etanolnom ekstraktu, a rezultati pokazuju da su dobivene vrijednosti masenih udjela najveće od svih 32 identificirana fenolna spoja. U dostupnim istraživanjima fenolnih spojeva lista tršlje, mirietin-ramnozid su identificirali i Bampouli i sur., (2014) što je u skladu s ovim istraživanjem.

Spojevi **19**, **26**, **28** identificirani i kvantificirani su prema standardu kvercetin-3-glukozida, pokazalo se da su strukturno slični i da je riječ o ***derivatima kvercetina***, a zajednička karakteristika im je da posjeduju zajednički fragmentni ion *m/z* 303, Kvercetin-rutinozid (spoj 19) ima prekursor ion *m/z* 611, dok fragmentni ioni ovog spoja ukazuju na gubitak heksoze (-162 amu) i ramnoze (-146 amu). MS/MS analiza pokazala je da je spoj 26 strukturno različit od spoja 19, iako im je osnovni kostur isti. Prema MS/MS spoj 26 identificiran je kao kvercetin pentozid za koji je karakteristično da ima prekursor ion m/z 435, dok fragmentni ion pokazuje da je došlo do gubitka pentozil jedinice (-132 amu). Nadalje, spoj 28 ima prekursor ion m/z 449, te fragmentni ion koji upućuje na gubitak ramnoze (-146 amu), što odgovara strukturi kvercetin-ramnozida (Carocho i sur., 2014). Od derivata kvercetina u ekstraktu lista tršlje najzastupljeniji je kvercetin-ramnozid, a određen je u masenom udjelu od 107,33 mg/100 g uzorka u metanolnom i 130,9 mg/100 g uzorka u etanolnom ekstraktu Njegova prisutnost je dokazana i u listovima i u bobicama tršlje u istraživanju koje su proveli Mehenni i sur., (2016).

Uz pomoć standarda kamferol-3-rutinozida, identificirani i kvantificirani su spojevi **23**, **24**, **27**, **29**, **30** i **32** kao ***derivati kamferola***, a navedeni spojevi imaju karakteristični fragmentni ion *m/z* 287. Svi navedeni spojevi identificirani su prema karakterističnim fragmentnim gubicima što je omogućilo njihovu identifikaciju. Spoj **23** je identificiran kao kamferol-3-glukozid (prekursor ion *m/z* 449, gubitak -162 amu što odgovara gubitku glukoze), spoj **24** kao kamferol-ramnozil-heksozid

(prekursor ion *m/z* 595, gubici -142 amu i -162 amu što odgovara gubitku ramnoze i heksoze), **27** kao kamferol-pentozil-heksozid (prekursor ion *m/z* 581, gubici -132 amu i -162 amu odgovaraju gubitku pentoze i heksoze), spoj **29** kao kamferol-pentozid (prekursor ion *m/z* 419, gubitak -132 amu koji odgovara gubitku pentoze), spoj **30** kao kamferol-ramnozid (prekursor ion *m/z* 433, gubitak -146 amu upućuje na gubitak ramnoze) i spoj **32** koji je identificiran kao kamferol-acetil-ramnozil-heksozid (prekursor ion *m/z* 637) (Barros i sur., 2013). Od svih identificiranih spojeva derivata kamferola s najvećim masenim udjelima određen je kamferol-3-glukozid čiji su maseni udjeli iznosili 15,22 mg/100 g u metanolnom i 19,5 mg/100 g uzorka u etanolnom ekstraktu lista tršlje. Bampouli i sur., (2014) također identificiraju derivate kamferola u listu tršlje.

Spojevi **31** i **33** pripadaju skupini flavonoida tj. podskupini ***flavona***, a identificirani su prema referentnim standardima kao što su luteolin i apigenin. Usporedbom vrijednosti rezultata masenih udjela luteolina i apigenina određenih u metanolnom i etanolnom ekstraktu lista tršlje, primijećeno je da su maseni udjeli luteolina značajno veći od onih od apigenina. Prisustvo luteolina u listovima tršlje potvrdili su istraživanjem Bampouli i sur., (2014).

### 4.3. Utjecaj abiotičkih faktora na prinos i sastav eteričnog ulja lista tršlje

Različiti okolišni čimbenici mogu svojim utjecajem značajno promijeniti kvalitativne i kvantitativne karakteristike eteričnog ulja, što znači da biljne vrste koje pripadaju istoj porodici ne moraju iskazivati iste ili slične reakcije u ovisnosti o okolišnim čimbenicima (Brant i sur., 2008). Utjecaj klimatskih promjena na kvalitativni i kvantitativni sadržaj eteričnih ulja dobivenih iz različitog biljnog materijala je tema mnogobrojnih istraživanja s ciljem identifikacije optimalnih uvjeta (vrijeme branja, fenološka faza biljke, lokacija, klimatski uvjeti, parametri destilacije) izolacije eteričnog ulja iz biljnog materijala u svrhu postizanje maksimalnog prinosa i optimalnog sastava aromatičnih spojeva.

***Tablica 22.*** Prinosi eteričnih ulja uzoraka lista tršlje ubranima na 4 lokacije tijekom 3 fenološke faze pomoću parne destilacije pri različitim tlakovima

| **Lokacija** | **Fenološka faza** | **p (bar)** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **0,3** | **0,7** | **1** |
| | | **I (%)** | | |
| **Barbariga** | 1 | 0,217 ± 0,01 | 0,267 ± 0,025 | 0,453 ± 0,015 |
| **Lun** | 1 | 0,182 ± 0,015 | 0,237 ± 0,015 | 0,413 ± 0,025 |
| **Hvar** | 1 | 0,348 ± 0,025 | 0,490 ± 0,02 | 0,633 ± 0,03 |
| **Vela Luka** | 1 | 0,365 ± 0,011 | 0,513 ± 0,02 | 0,767 ± 0,02 |
| **Barbariga** | 2 | 0,123 ± 0,025 | 0,157 ± 0,015 | 0,203 ± 0,025 |
| **Lun** | 2 | 0,117 ± 0,03 | 0,113 ± 0,015 | 0,233 ± 0,015 |
| **Hvar** | 2 | 0,163 ± 0,025 | 0,303 ± 0,025 | 0,426 ± 0,026 |
| **Vela Luka** | 2 | 0,173 ± 0,015 | 0,411 ± 0,027 | 0,492 ± 0,02 |
| **Barbariga** | 3 | 0,140 ± 0,026 | 0,185 ± 0,011 | 0,351 ± 0,017 |
| **Lun** | 3 | 0,132 ± 0,027 | 0,142 ± 0,013 | 0,379 ± 0,013 |
| **Hvar** | 3 | 0,215 ± 0,04 | 0,396 ± 0,014 | 0,517 ± 0,015 |
| **Vela Luka** | 3 | 0,243 ± 0,027 | 0,485 ± 0,017 | 0,559 ± 0,017 |

p - tlak (bar); I - ostvareni prinos (%)
1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

Panel grupa, koju je sačinjavalo 10 certificiranih ocjenjivača Ireks Arome d.o.o., vizualnim i osjetilnim pregledom ocijenila je organoleptičke karakteristike svih uzoraka eteričnih ulja lista tršlje dobivenih parnom destilacijom. Rezultati ocjenjivanja panela su pokazali da je boja izoliranih

eteričnih ulja tršlje dobivenih sa različitih lokacija tijekom fenoloških faza varirala od blijedo-žute do žute boje, aromatično-zeleno-začinskog mirisa što je u skladu s organoleptičkim karakteristikama eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Maroka (Zrira i sur., 2003).

***Utjecaj tlaka na prinos eteričnog ulja tršlje***

Iz prezentiranih rezultata u *Tablici 22* može se uočiti da se primjenom različitih tlakova postižu različiti prinosi eteričnog ulja tršlje, te da se primjenom najvišeg tlaka od 1 bara tijekom procesa parne destilacije postižu najveći prinosi eteričnog ulja lista tršlje.

Najviši prinos je postignut parnom destilacijom pri tlaku od 1 bara (0,767 %) a najniži pri tlaku od 0,3 bara (0,117 %) (*Tablica 22*). Prinos od 0,767 %, koji je postignut destilacijom pri 1 baru tijekom fenološke faze 1, je sličan prinosima eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Tunisa (0,4 %) (Lo Presti i sur., 2008), Korzike (0,2 - 0,5 %) (Zrira i sur., 2003), ali viši od dobivenog prinosa eteričnog ulja porijeklom iz Maroka (0,2 %) (Barra i sur., 2007), Italije (0,3 %) (Negro i sur., 2014), Sardinije (0,3%) (Douissa i sur., 2005) i Sicilije (0,1 %) (Castola i sur., 2000). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem utjecaja tlaka (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 bara) na prinos eteričnog ulja iz latica Bugarske ruže (*Rosa damascena* Mill.) koje su proveli Babu i sur. (2002). Njihovi rezultati su pokazali da je najveći prinos eteričnog ulja postignut pri destilaciji primjenom najvišeg tlaka od 0,8 bara.

***Utjecaj fenološke faze i lokacije na prinos eteričnog ulja tršlje***

Lokacija i fenološka faza biljke definirane su okolišnim čimbenicima (varijacije u temperaturi i svjetlosti, količini oborina, vjetaru, geografskim karakteristikama) koji u različitim biljnim vrstama uzrokuju različite odgovore na novonastale stresne uvjete kao što je pad ili rast udjela eteričnog ulja u biljci tijekom neke fenološke faze. Mnogobrojna istraživanja provedena na raznovrsnom biljnom materijalu su dokazala ovisnost prinosa eteričnih ulja o fenološkoj fazi biljke (Maizi i sur., 2019) i lokaciji (Souto-Bachiller i sur., 1997).

Uspoređujući prinose eteričnog ulja dobivenih destilacijom uzoraka lista tršlje u ovisnosti o fenološkoj fazi biljke (*Tablica 24*) može se zaključiti da su najveći prinosi eteričnog ulja lista tršlje postignuti tijekom FF 1 u kojoj je najveći prinos eteričnog ulja tršlje je dobiven iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Vela Luka (0,767 %), potom s Hvara (0,633 %), a zatim slijede prinosi

eteričnih ulja dobiveni iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (0,453 %) i najniži iz Luna (0,413 %). Isti trend je primijećen i za FF 2 i 3.

Varijacije u prinosima po fenološkim fazama eteričnih ulja lista tršlje dobivenih iz uzoraka tršlje iz lokacije Vele Luke se preslikavaju i na prinose eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka tršlje iz ostalih lokacija Barbariga, Lun i Hvar. Možebitni razlog najvećeg prinosa tijekom FF 1 je činjenica da biljke proizvode eterična ulja tijekom cvatnje kako bi privukle oprašivače (Palá-Paúl i sur., 2001). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Zrira i sur. (2003) u kojem su utvrdili da najveći prinos eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Maroka je dobiven tijekom fenološke faze cvatnje. Naghdi Badi i sur. (2004) su istraživanjem dokazali da se najveći prinos eteričnog ulja dobivenog iz biljke *Thymus vulgaris* L. postiže tijekom fenološke faze cvatnje što je dokazano i na drugim vrstama biljnog materijala kao što su *Salvia officinalis* (Farhat i sur., 2016), *Hyptis suaveolens* (Oliveira i sur., 2005), *Satureja rechingeri* (Sefidkon i sur., 2007), *Origanum majorana* (Hamrouni Sellami i sur., 2009) i ostalima.

Iz bioklimatskih podataka (*Tablica 4*), tijekom FF 1 zabilježene su vrlo slične vrijednosti prosječne temperature (17,20 - 19,70 °C) i prosječne insolacije (289,40 - 318,10 h) za sve lokacije, ali uočene su značajne razlike u vrijednostima prosječnih oborina između lokacija Hvar (33,30 mm) i Vela Luke (19,30 mm), te Barbarige (84,20 mm) i Luna (48,70 mm). Iako su tijekom FF 1 postignuti najveći prinosi eteričnog ulja lista tršlje, usporedbom prinosa između lokacija FF 1, vidljivo je da uzorci s lokacija Barbariga i Lun imaju nešto niže prinose eteričnog ulja koji mogu biti posljedica povišene količine oborina. Castelo i sur. (2012) su istraživanjem okolišnih čimbenika na prinos eteričnog ulja *B. salicifolis* i *P. myrsinites* došli do zaključka da biljke postižu veće prinose eteričnog ulja tijekom sezone s manjom količinom oborina. Meier i Mediavilla (1998) su pretpostavili da biljka *Cannabis sativa* L. daje manje prinose eteričnog ulja kada je biljka izložena znatnoj količini kiše, a pretpostavili su da je razlog uništenja trihoma.

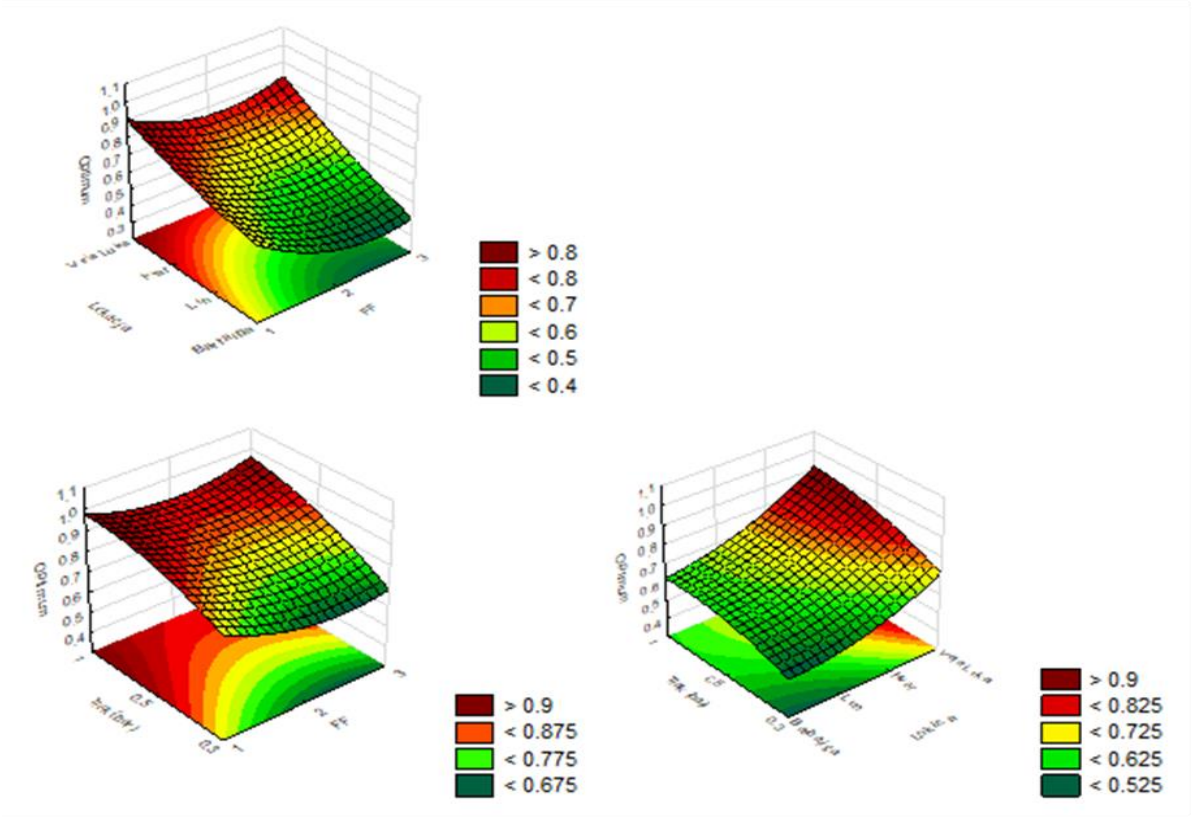
Tijekom FF 2 uočeno je da je na svim lokacijama došlo do smanjenja u prinosu eteričnih ulja lista tršlje, najvjerojatnije uzrokovano promjenom u okolišnim čimbenicima. U odnosu na klimatske uvjete tijekom FF 1, tijekom FF 2 došlo je do značajnog porasta prosječne temperature za 41,90 % i prosječne insolacije za 19,41 % ali pada u količini oborina za 92,11 %. Tijekom FF 2, u odnosu na FF 1, došlo je do pada prinosa eteričnih ulja dobivenih destilacijom uzoraka tršlje ubranih sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka za 50,84 %, 35,70 %, 53,16 % i 52,60 % zbog novonastalih klimatskih uvjeta (povišena temperatura) koji su uzorkovali stresne uvjete rasta

tršlje na način da je došlo do dehidracije biljke (Hazzoumi i sur., 2015) što je imalo za posljedicu manju proizvodnju eteričnog ulja u biljci (Alavi-Samani i sur., 2013; Khorasaninejad i sur., 2011). Tijekom FF 2, ističu se prinosi eteričnog ulja tršlje dobiveni destilacijom uzoraka tršlje koji su ubrani sa lokacija Hvar i Vela Luka, a koji su u prosijeku viši za 41,00 % od prinosa eteričnih ulja dobivenih destilacijom iz uzoraka tršlje ubranima sa lokacija Barbariga i Lun. Iz bioklimatskih podataka (*Tablica 4)* može se uočiti da na lokacijama Hvar i Vela Luka tijekom FF 2 nisu zabilježene oborine što je u biljci uzorkovalo stres prouzročen nedostatkom vode što je za posljedicu imalo povećanje prinosa eteričnog ulja. Nedostatak vode u biljkama može prouzročiti razne fiziološke poremećaje kao što je redukacija fotosinteze (Sarker i sur., 2005), te značajne promjene u prinosu i sastavu eteričnih ulja. Pod uvjetima stresa kao što je nedostatak vode dolazi do smanjenja površine lista i zgušnjavanja žlijezda čime dolazi do povećanje akumulacije eteričnog ulja (Simon i sur., 1992). Baher i sur. (2002) su provedenim istraživanjem dokazali da stres prouzrokovan nedostatkom vode u biljci *Satureja Hortensis* uzrokuje povećanu akumulaciju eteričnog ulja, a time i sami prinos.

U odnosu na FF 2, tijekom FF3 dolazi do povećanja prinosa eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka tršlje ubranih sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka u rasponu od 12,82 - 72,90 %. Mogući razlog tome je stabilizacija bioklimatskih uvjeta na svim lokacijama tj. umjerenih vrijednosti prosječene temperature (14,40 - 17,50 °C), prosječne insolacije (174,40 - 243,10 h) i prosječne količine oborina (25,30 - 40,50 mm). Iako tijekom FF 3 dolazi do povećanja prinosa eteričnog ulja, prinos je manji za u prosjeku za 30 % za eterična ulja dobivena iz uzoraka tršlje ubranih sa svih lokacija, u odnosu na prinose eteričnih ulja dobivene iz uzoraka tršlje ubranih tijekom FF 1.

Tijekom svih fenoloških faza, primijećene su sličnosti u prinosima eteričnih ulja lista tršlje dobivenih iz uzoraka tršlje ubranima sa lokacija Hvar i Vela Luka, te prinosa eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka tršlje ubranih sa lokacija Barbariga i Lun. Lokacije i fenološke faze biljke su se međusobno razlikovale po klimatskim uvjetima i geografskom položaju uzoraka (*Tablica 4*). Uzorci tršlje ubrani sa lokacije Barbariga su rasli najmanje udaljeni od morske obale sa djelomičnim pristupom sunčevoj svjetlosti tijekom dana, uzorci sa lokacije Lun su bili potpuno zaklonjeni (u hladu) okolnom florom, a uzorci tršlje ubrani sa lokacija Hvar i Vela Luka na visinama od 330 m i 45 m su bili izloženi direktnoj sunčevoj svjetlosti tijekom cijelog dana. Iz navedenog može se zaključiti da osim očite promjene u ključnom abiotičkom faktoru kao što je

nedostatak vode, kombinirani utjecaj ostalih okolišnih faktora ima izraziti utjecaj na proizvodnju tj. prinos eteričnih ulja u listu tršlje. Fernandes i sur. (2013) su istraživanjem utjecaja količine svjetlosti i visine kao limitirajućih čimbenika na rast i razvoj *Ocimum gratissimum,* pokazali da sa povećanjem visine dolazi po povećanja u izlaganju biljke sunčevoj svjetlosti te da time dolazi do mijenjanja morfoloških karakteristika lista (njegovog zadebljanja), povećanja biomase biljke, a samim time i povećanja prinosa eteričnog ulja.




***Slika 27.*** Optimalni uvjeti dobivanja eteričnog ulja iz lista tršlje postupkom parne destilacije u ovisnosti o fenološkoj fazi, lokaciji i primjenjenom tlaku

Na *Slici 27* su prikazani trodimenzionalni prikazi odzivnih površina optimalnih uvjeta dobivanja eteričnih ulja iz lista tršlje postupkom parne destilacije u ovisnosti o fenološkoj fazi, lokaciji i primijenjenom tlaku. Iz rezultata se može zaključiti da se se optimalni uvjeti postižu pri tlaku od 1 bara, destilacijom biljke tijekom tijekom FF 1 ubranom sa lokacije Vela Luka.

Tako optimirani uzorci eteričnih ulja lista tršlje su dalje korišteni u kvantificiranju i identifikaciji sastavnica pomoću GC-MS analize i određivanju antimikrobnog utjecaja eteričnog

ulja lista tršlje na odabrane sojeve mikroorganizama (*Erwinia amylovora* soj EaED, *Escherichia coli* soj AB1157.)

### 4.4. Sastavnice eteričnog ulja lista tršlje (*Pistacia lenticus* L.)

Pomoću GC-MS analize identificirano je 56 sastavnica koji predstavljaju 99,19 – 100 % ukupnog sastava eteričnog ulja dobivenog iz lista tršlje procesom parne destilacije (*Tablica 23*). Kao glavne sastavnice identificirani su α-pinen (9,19 - 23,88%), limonen (6,38 - 12,45%) i β-pinen (2,43 - 12,17 %). Ostale značajne sastavnice su mircen (1,04 - 12,51 %), sabinen (1,33-19,82 %), germakren D (1,63 - 11,68 %), α-terpinen (1,89 - 6,35 %), γ-terpinen (2,59 - 8,96 %), terpinen-4-ol (1,75 - 8,64 %), β-kariofilen (1,36 - 4,73 %) i δ-kadinen (1,92 - 4,85 %).

***Tablica 23.*** Sastavnice eteričnog ulja lista tršlje dobivenih iz uzoraka lista tršlje branima na lokacijama Barbariga, Pag, Hvar i Vela Luka tijekom tri fenološke faze pomoću parne destilacije pri talku od 1 bara

| RT | RI | Sastavnica | B1 | B2 | B3 | L1 | L2 | L3 | H1 | H2 | H3 | VL1 | VL2 | VL3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **5,86** | **853** | **3-heksen-1-ol** | n.d. | 0,36 | n.d. | n.d. | 0,53 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,21 | 0,39 |
| **6,12** | **866** | ***n*-heksanol** | n.d. | 0,11 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,1 | n.d. |
| **7,52** | **927** | **triciklen** | 0,98 | 0,30 | 0,34 | 0,37 | 0,40 | 0,32 | 0,33 | 0,82 | 0,46 | 0,45 | 0,87 | 0,32 |
| **7,59** | **931** | **α-tujen** | 0,86 | 0,16 | 0,22 | 0,30 | 0,33 | 0,14 | 0,38 | 2,15 | 0,32 | 0,14 | 0,19 | 0,70 |
| **7,84** | **939** | **α-pinen** | 9,19 | 19,32 | 21,22 | 16,15 | 19,51 | 11,70 | 11,31 | 23,88 | 10,61 | 21,91 | 23,26 | 9,23 |
| **8,24** | **954** | **kamfen** | 2,48 | 1,39 | 1,84 | 1,66 | 1,58 | 1,55 | 1,61 | 3,53 | 1,91 | 1,93 | 3,39 | 1,24 |
| **8,89** | **977** | **sabinen** | 5,25 | 9,65 | 4,01 | 8,74 | 19,82 | 2,25 | 1,33 | 1,40 | 3,94 | 7,95 | 6,02 | 6,34 |
| **9,03** | **982** | **β-pinen** | 4,75 | 9,90 | 9,10 | 3,13 | 2,43 | 6,30 | 5,89 | 11,88 | 4,62 | 7,23 | 12,17 | 3,96 |
| **9,33** | **992** | **mircen** | 10,13 | 1,16 | 3,89 | 1,07 | 1,18 | 15,08 | 12,51 | 2,02 | 8,89 | 1,04 | 1,66 | 4,01 |
| **9,64** | **1004** | **3-heksen-1-ol acetat** | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,33 |
| **9,79** | **1008** | **α-felandren** | 5,32 | 2,56 | 1,76 | 2,64 | 0,92 | 4,03 | 3,71 | 2,97 | 1,72 | 0,58 | 3,15 | 4,86 |
| **10,04** | **1018** | **1,4-cineol** | n.d. | n.d. | 0,05 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,29 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| **10,14** | **1020** | **α-terpinen** | 1,89 | 3,33 | 6,35 | 5,30 | 4,86 | 4,14 | 4,00 | 5,11 | 6,16 | 2,63 | 2,34 | 4,59 |
| **10,38** | **1028** | ***p*-cimen** | 2,48 | 0,65 | 0,77 | 0,91 | 1,23 | 0,93 | 1,91 | 0,97 | 1,47 | 0,91 | 0,69 | 1,91 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **10,57** | **1034** | **limonen** | 7,63 | 9,45 | 10,24 | 7,18 | 6,38 | 9,22 | 9,92 | 12,45 | 7,99 | 7,50 | 10,22 | 7,32 |
| **10,64** | **1038** | ***cis*- β-ocimen** | n.d. | n.d. | 0,28 | n.d. | n.d. | 0,72 | 0,33 | 0,12 | 0,73 | n.d. | 0,24 | n.d. |
| **11,03** | **1049** | **trans-β-ocimen** | 0,27 | 0,29 | 1,19 | n.d. | 0,14 | 2,73 | 1,44 | 0,6 | 2,01 | 0,22 | 1,23 | 0,35 |
| **11,18** | **1056** | **pentil izobutanoat** | 0,33 | 0,26 | 0,75 | 0,68 | 0,56 | 0,29 | 0,97 | 0,19 | 0,58 | 0,41 | 0,29 | 0,8 |
| **11,27** | **1058** | **izopentil butanoat** | n.d. | 0,08 | 0,2 | 0,23 | 0,12 | 0,09 | 0,23 | n.d. | 0,15 | n.d. | n.d. | 0,28 |
| **11,46** | **1062** | **γ-terpinen** | 2,59 | 5,35 | 8,96 | 7,91 | 7,32 | 5,70 | 5,09 | 7,15 | 7,59 | 4,01 | 3,50 | 5,69 |
| **11,88** | **1076** | ***p*-menta-3,8-dien** | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,19 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| **12,44** | **1091** | **terpinolen** | 1,70 | 1,83 | 3,47 | 3,26 | 2,44 | 2,68 | 4,27 | 3,24 | 4,47 | 1,81 | 1,45 | 3,18 |
| **12,73** | **1099** | **2-metilbutil izovalerat** | n.d. | 0,08 | 0,20 | 0,31 | 0,15 | 0,22 | 0,36 | 0,08 | 0,32 | 0,17 | 0,11 | 0,41 |
| **12,85** | **1102** | **izopentil izovalerat** | 0,30 | 0,09 | 0,32 | 0,30 | 0,13 | 0,13 | 0,47 | 0,16 | 0,40 | 0,19 | 0,12 | 0,34 |
| **15,48** | **1182** | **terpinen-4-ol** | 1,75 | 5,72 | 8,40 | 8,21 | 8,64 | 4,72 | 5,92 | 6,69 | 8,31 | 3,37 | 4,03 | 6,90 |
| **15,90** | **1193** | **α-terpinol** | 0,41 | 0,59 | 1,57 | 0,81 | 0,57 | 1,21 | 3,91 | 1,94 | 1,64 | 0,45 | 0,94 | 1,49 |
| **16,11** | **1201** | **γ-terpinol** | n.d. | n.d. | 0,24 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,11 | n.d. | n.d. | 0,82 |
| **17,78** | **1251** | **pentil izoheksanoat** | n.d. | 0,16 | 0,09 | 0,38 | 0,36 | n.d. | 0,19 | 0,05 | 0,21 | 0,27 | 0,20 | 0,36 |
| **17,88** | **1254** | **izopentil heksanoat** | n.d. | 0,05 | n.d. | n.d. | 0,12 | n.d. | 0,35 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| **19,14** | **1289** | **bornil acetat** | 1,09 | 0,13 | 0,76 | 0,50 | 0,29 | 0,53 | 0,26 | 0,88 | 0,71 | 1,03 | 1,59 | 1,41 |
| **19,25** | **1292** | **undekanon** | 0,49 | 0,12 | 0,25 | 0,83 | 0,44 | 0,36 | 0,69 | n.d. | 0,89 | 0,78 | 0,25 | 1,05 |
| **21,15** | **1353** | **α-terpenil acetat** | n.d. | n.d. | 0,05 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,80 | n.d. | 0,63 | 1,13 | 0,10 | n.d. |
| **21,26** | **1356** | **α-kubaben** | 0,39 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,10 | n.d. | n.d. | n.d. |
| **22,21** | **1383** | **α-kopaen** | 1,52 | 0,50 | 0,14 | 0,62 | 0,29 | 0,26 | 0,55 | 0,12 | 0,74 | 0,84 | 0,58 | 0,68 |
| **22,68** | **1397** | **β-kubaben+ β-elemen** | 1,68 | 0,52 | 0,15 | 0,76 | 0,35 | 0,25 | 0,42 | n.d. | 0,55 | 0,90 | 0,42 | 1,12 |
| **23,68** | **1430** | **β-kariofilen** | 3,80 | 2,05 | 1,36 | 1,95 | 3,22 | 2,12 | 3,69 | 3,56 | 3,03 | 3,12 | 2,86 | 4,73 |
| **24,01** | **1442** | **izopentil benzoat** | 0,44 | 0,11 | 0,29 | 0,32 | 0,07 | 0,22 | 0,40 | 0,11 | 0,29 | 0,16 | 0,12 | 0,35 |
| **24,61** | **1461** | **murola-3,5-dien** | 0,62 | 0,17 | 0,09 | 0,29 | 0,08 | 0,18 | 0,27 | 0,06 | 0,32 | 0,33 | 0,21 | 0,54 |
| **24,74** | **1466** | **α-humulen** | 1,71 | 1,36 | 0,48 | 1,28 | 0,63 | 0,7 | 1,22 | 0,61 | 1,29 | 1,65 | 1,11 | 1,63 |
| **24,98** | **1473** | **alloaromadendren** | 1,09 | 0,52 | 0,07 | 0,54 | 0,19 | 0,19 | 0,30 | 0,07 | 0,45 | 0,65 | 0,39 | 0,56 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **25,40** | **1487** | **γ-murolen** | 2,54 | 1,14 | 0,44 | 1,43 | 0,60 | 0,65 | 1,19 | 0,37 | 1,41 | 1,67 | 1,09 | 1,54 |
| **25,61** | **1493** | **germakren D** | 6,00 | 11,68 | 2,47 | 7,84 | 9,02 | 3,00 | 3,00 | 1,63 | 5,30 | 10,38 | 6,96 | 5,90 |
| **25,94** | **1504** | **murola-4(14),5-dien** | 1,50 | 0,46 | 0,14 | 0,59 | 0,23 | 0,29 | 0,33 | 0,10 | 0,53 | 0,83 | 0,42 | 0,86 |
| **26,11** | **1510** | **α-murolen** | 3,27 | 1,66 | 0,77 | 1,97 | 0,98 | 1,12 | 1,50 | 0,47 | 1,39 | 2,60 | 1,44 | 2,64 |
| **26,18** | **1513** | **farnezen** | 0,56 | 0,20 | 2,40 | 0,31 | n.d. | 1,77 | 0,37 | 0,46 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| **26,26** | **1515** | **β-bisabolen** | 0,60 | 0,11 | n.d. | 0,23 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,24 | 0,44 | 0,12 | 1,32 |
| **26,55** | **1525** | **γ-kadinen** | 1,49 | 0,35 | 0,13 | 0,68 | 0,20 | 0,34 | 0,33 | 0,06 | 0,31 | 0,72 | 0,27 | 0,98 |
| **26,80** | **1533** | **δ-kadinen** | 4,44 | 3,66 | 2,92 | 4,85 | 2,27 | 3,06 | 3,68 | 1,92 | 3,73 | 4,84 | 3,39 | 3,55 |
| **26,90** | **1536** | **β-kadinen** | 0,79 | 0,32 | 0,22 | 0,45 | 0,12 | 0,37 | 0,60 | 0,26 | 0,44 | 0,45 | 0,32 | 0,46 |
| **27,09** | **1543** | **kadina-1(2),4-dien** | 0,72 | 0,19 | 0,10 | 0,49 | 0,07 | 0,19 | 0,31 | 0,10 | 0,34 | 0,35 | 0,18 | 0,39 |
| **27,25** | **1548** | **α-kadinen** | 0,55 | n.d. | n.d. | 0,32 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,11 | 0,26 | n.d. | 0,57 |
| **28,14** | **1576** | **3-heksen-1-ol benzoat** | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,22 | 0,12 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| **30,30** | **1651** | **τ-kadinol** | 1,93 | 0,71 | 0,45 | 1,53 | 0,31 | 1,29 | 0,91 | 0,47 | 0,79 | 1,38 | 0,49 | 1,05 |
| **30,41** | **1655** | **δ-kadinol** | 0,45 | 0,11 | 0,06 | 0,23 | n.d. | 0,20 | 0,47 | 0,07 | 0,12 | 0,20 | n.d. | 0,18 |
| **30,66** | **1664** | **α-kadinol** | 1,37 | 0,50 | 0,29 | 1,14 | 0,21 | 0,72 | - | 0,30 | 0,46 | 0,84 | 0,24 | 0,81 |
| **31,42** | **1690** | **α-bisabolol** | n.d. | n.d. | n.d. | 0,20 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,13 | n.d. | n.d. |
| | | **Ukupno** | 99,99 | 100 | 99,9 | 99,97 | 99,9 | 99,19 | 99,99 | 99,85 | 99,98 | 99,97 | 99,99 | 99,96 |

RT- retencijsko vrijeme; RI- retencijski indeks; n.d. – nije detektirano

B - lokacija Barbariga; L - lokacija Lun; H - lokacija Hvar; VL - lokacija Vela Luka

1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

Dostupna istraživanja sastava eteričnih ulja lista tršlje iz različitih zemalja su pokazala postojanje nekoliko različitih vrsta kemotipova koje karakteriziraju dominantne sastavnice kao što su mircen (19,00 %, Španjolska) (Boelens i Jimenez, 1991), α-pinen (15,00 %, Francuska) (Buil i sur., 1974), terpinen-4-ol (22,00 %, Sardinija; 33,00 – 44,00 %, Maroko) (Picci i sur., 1987; Zrira i sur., 2003), δ-3-karen (65,00 %, Egipat) (De Pooter i sur., 1991) i α -terpineol (13,00 %, Izrael) (Fleisher i Fleisher, 1992). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Gardeli i sur. (2008), a koji su dokazali da su glavne sastavnice u eteričnom ulju lista tršlje porijeklom iz Grčke α-pinen (9,40 – 24,9 %) i limonen (9,00 – 17,80 %), a ostale sastavnice u visokom postotku su germakren D (2,70 – 13,50 %), terpinen-4-ol (6,80 - 10,60 %), β-pinen (2,00 – 6,90 %), sabinen (1,00 – 6,70 %), γ-terpinen (3,10 – 3,60 %) i α-terpineol (2,50 – 4,00 %). Nadalje, rezultati ovog istraživanja su također i u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Derwich i sur. (2010). Njihovim istraživanjem je identificirano i kvantificirano 23 sastavnica eteričnog ulja lista tršlje, a glavnim sastavnicama su određeni α-pinen (24,25 %), β-pinen (12,58 %), limonen (7,56 %), terpinen-4-ol (6,98 %), α-terpineol (4,89 %) i mircen (2,09 %). Također, rezultati su vrlo slični istraživanjima provedenim na identifikaciji sastava eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Italije (Sardinija), Maroka, Tunisa, Grčke i Francuske, u kojemu su α-pinen i terpinen-4-ol određeni kao dominantne sastavnice (Barra i sur., 2007; Douissa i sur., 2003; Zrira i sur., 2003; Castola i sur., 2000; Gardeli i sur., 2008). Prema istraživanju koje su proveli Ismail i sur. (2012), identifikacijom 27 sastavnica (98,90 % ukupnog sastava) identificirali su glavne sastavnice eteričnog ulje lista tršlje porijeklom iz Tunisa (regija Korbous) kao α-pinen (20,60 %), limonen (15,30 %), β-pinen (9,60 %), germakren D (8,40 %) i terpinen-4-ol (8,20 %).

Najveći udjeli ***α-pinena*** tijekom FF 2 su određeni u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Hvar (23,88 %), Vela Luka (23,26 %) i Lun (19,51 %), a najniži udjeli na istim lokacijama su određeni tijekom FF 3 u vrijednostima od 10,61 %, 9,23 % i 11,70 %. U eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Barbariga, najveći udjeli α-pinena su određeni tijekom FF 3 (21,22 %), a najniži tijekom FF 1 (9,19 %).

Najveći određeni udjeli α-pinena u uzorcima eteričnih ulja lista tršlje dobivenih iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Lun, Hvar i Vele Luke, su posljedica kombiniranog djelovanja povećane insolacije i smanjene količine oborina tijekom FF 2. Prema istraživanju koje su proveli Feijó i sur. (2014), najveći udjeli α-pinena u eteričnom ulju biljke *Varronia curassavica* su posljedica insolacije što ujedno dokazuje da je α-pinen spoj ovisan o bioklimatskim čimbenicima. Nadalje,

istraživanje koje su proveli Serralutzu i sur. (2020) je pokazalo da α-pinen, glavna sastavnica eteričnog ulja dobivenog iz biljke *Rosmarinus officinalis* porijeklom sa Sardinije, iskazuje značajnu statističku korelaciju s temperaturom zraka, tj. da s njenim povećanjem dolazi do povećanja udjela α-pinena tijekom fenoloških faza. Postoji više mogućih uzroka koji imaju za posljedicu razliku u udjelima sastavnica eteričnih ulja. Naime, biosinteza sastavnica eteričnih ulja uvjetovana je različitim okolišnim čimbenicima koji značajno utječu na njihov udio. Neki od tih čimbenika su intenzitet svjetlosti, klimatski uvjeti i dostupnost hranjivih tvari u tlu (Ben Taarit i sur., 2010; Sarmoum i sur., 2019). Lakušić i sur. (2013) su u svom radu naveli da razlike u udjelima i kvaliteti eteričnih ulja ovise o različitim čimbenicima kao što su razlike prisutne između biljnih vrsta, zatim o korištenju različitih dijelova biljaka za izoalciju, stadiju razvoja u kojem je ubrana, kao i mogućnost uzgoja biljaka na različitim lokacijama pri čemu dolazi do promjena u kemijskom sastavu biljaka uslijed njihove prilagodbe na različite okolišne uvjete.

Najveći udjel limonena u vrijednosti od 12,45 % je određen u eteričnom ulju lista tršlje dobivenom iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacije Hvar tijekom FF 2, a najniži u vrijednosti od 6,38 % je određen u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun također tijekom FF 2. Udjeli limonena u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz uzoraka tršlje koji su ubrani sa lokacija Lun i Barbariga su dosegli najveće udjele tijekom FF 3 (10,24 % i 9,92 %), dok su najveći udjeli limonena iz uzoraka eteričnih ulja dobivenih iz lista tršlje ubranim sa lokacija Hvar i Vela Luka određeni tijekom FF 2 (12,45 % i 10,22 %). Najveći udjeli limonena koji su određeni tijekom FF 2 u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Hvar i Vela Luka, su posljedica povećanja prosječne temperature i prosječne insolacije, dok udjeli limonena određeni u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka tršlje ubrani sa lokacija Barbarige i Luna su posljedica smanjenja količine oborina tijekom FF 3. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Sgarbossa i sur. (2019) u kojemu su dokazali da u eteričnom ulju *Aloysia triphylla* udjeli limonena ovise o okolišnim čimbenicima kao što su prosječna temperatura zraka i količina oborina tj. udjeli limonena opadaju s izlaganjem biljke velikoj količine vode, a rastu s porastom temperature.

Najveći udjeli β-pinena su određeni u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Vela Luka (12,17 %), Hvar (11,88 %) i Barbariga (9,90 %) tijekom FF 2, a sa lokacije Lun tijekom FF 3 (6,30 %). Povećana sinteza β-pinena odgovara uvjetima povećane prosječne temperature i insolacije tijekom kolovoza za eterična ulja dobivena iz biljnog materijala

ubranim sa lokacija Barbariga, Hvar i Vela Luka. Kasna sinteza β-pinena u uzorcima eteričnog ulja dobivenog iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacije Lun, također može biti posljedica povećane dostupnosti sunčeve svjetlosti jer se biljka u prve 2 fenološke faze razvijala zaklonjena ostalom florom koja je bila viša od nje, a tijekom FF 3 ta flora je započela ciklus kraja vegetacije ili dormitativnu fazu (gubi lišće) što je *P. lentiscus* omogućilo pristup sunčevoj svjetlosti.

Najveći udjeli glavnih sastavnica (α-pinen, limonen i β-pinen) eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Grčke, u ovisnosti o fenološkoj fazi, su određeni tijekom faze cvatnje (svibanj) (Gardeli i sur., 2008), dok u ovom istraživanju najveći udjeli istih sastavnica su određeni tijekom fenološke faze ranog ploda (kolovoz). Naime, u Grčkoj tijekom svibnja prosječne temperature su znatno više u odnosu na Jadranskoj obali, a poznato je da temperatura kao abiotički čimbenik ima znatan utjecaj na biosintezu sastavnica eteričnih ulja. Također, istraživanje Gardeli i sur. (2008) je pokazalo da sa krajem cvatnje je došlo do pada udjela glavnih sastavnica što je u skladu s ovim istraživanjem jer kako se može uočiti iz *Tablice 23*, nakon FF 2 dolazi do znatnog pada sastavnica tijekom FF 3. Prema Nhu-Trang i sur. (2006) pad udjela sastavnica u eteričnom ulju se može pripisati biosintezi oksidiranih spojeva kao što je npr. *p*-cimen koji je njihov prekursor.

Udjeli mircena su pokazali najveću varijabilnost od svih identificiranih sastavnica u eteričnim uljima lista tršlje između fenoloških faza jedne lokacije što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Barra i sur. (2007) opisujući mircen u eteričnom ulju lista tršlje porijeklom iz Italije kao najvarijabilniju sastavnicu. Udjeli mircena su određeni u rasponu od 1,04 – 15,08 %, s najvećim udjelom određenim u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz lista tršlje ubranom sa lokacije Lun (15,08 %) tijekom FF 3, a najnižim od 1,04 % određen je u eteričnom ulju dobivenom iz lista tršlje ubranim sa lokacije Vela Luka tijekom FF 1. Udjeli mircena u uzrocima eteričnih ulja dobivenih iz lista tršlje ubranima sa lokacija Barbariga i Hvar su se smanjili za 79,45 % i 72,19 % tijekom prijelaza između FF 1 u FF 2, dok se u uzorcima eteričnih ulja dobivenih iz lista tršlje ubranima sa lokacija Lun i Vela Luka dogodio porast od 85,48 % i 41,44 % iz FF 2 u FF 3. Osim mircena, značajnu varijabilost u ovisnosti o fenološkim fazama i lokaciji pokazuje i sabinen, čiji je najmanji udjel u vrijednosti od 1,33 % određen u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz uzorka lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar tijekom FF 1, a najveći od 19,82 % u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun tijekom FF 2.

Pored kvantitativnih varijacija zajedničkih sastavnica, vidljive su i varijacije u prisutnosti ili nedostatku sastavnica tijekom fenoloških faza ili lokacija što je posljedica genetičkog utjecaja ali i

okolišnih čimbenika koji uzrokuju vrijacije u sastavu sekundarnih metabolita (Feijó i sur., 2014). Sastavnica 3-heksen-1-ol je identificirana i kvantificirana tijekom FF 2 u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (0,36 %), Lun (0,53 %) i Vela Luka (0,21 %), ali i tijekom FF 3 u eteričnom ulju dobivenom iz lista tršlje ubranima sa lokacije Vele Luke (0,39 %). Tijekom FF 2, *n*-heksanol je identificiran i kvantificiran u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Barbarige (0,11 %) i Vele Luke (0,1 %). Sastavnica 1,4-cionel je identificirana samo u uzorcima eteričnog ulja dobivenog iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga tijekom FF 3 (0,05 %) i Hvara tijekom FF 2 (0,29 %). Monoterpenski alkohol, γ-terpinol identificiran i kvantificiran je samo tijekom FF 3 u uzorcima eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (0,24 %), Hvar (0,11 %) i Vela Luka (0,82 %).

***Tablica 24.*** Udjeli kemijskih grupa u uzrocima eteričnih ulja dobiveni parnom destilacijom uzoraka lista tršlje ubranima sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka tijekom 3 fenološke faze

| **Kemijska skupina** | **Lokacija i fenološka faza** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **B1** | **B2** | **B3** | **L1** | **L2** | **L3** | **H1** | **H2** | **H3** | **VL1** | **VL2** | **VL3** |
| **Monoterpeni** | 54,67 | 64,43 | 71,91 | 56,99 | 67,32 | 66,15 | 62,08 | 76,67 | 60,66 | 57,41 | 69,66 | 52,11 |
| **Monoterpenski alkoholi** | 2,16 | 6,31 | 10,21 | 9,02 | 9,21 | 5,93 | 9,83 | 8,63 | 10,06 | 3,82 | 4,97 | 9,21 |
| **Monoterpenski oksidi** | 0,00 | 0,00 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **Monoterpenski esteri** | 1,09 | 0,13 | 0,81 | 0,5 | 0,29 | 0,53 | 1,06 | 0,88 | 1,34 | 2,16 | 1,69 | 1,41 |
| **Seskviterpeni** | 31,94 | 24,57 | 11,66 | 23,83 | 18,13 | 14,12 | 17,16 | 9,53 | 19,73 | 29,32 | 19,44 | 26,44 |
| **Seskviterpenski alkoholi** | 4,53 | 1,49 | 0,91 | 3,6 | 0,52 | 2,63 | 1,78 | 0,94 | 1,78 | 3,12 | 0,88 | 2,37 |
| **Alifatski esteri** | 0,63 | 0,72 | 1,56 | 1,90 | 1,44 | 0,73 | 2,57 | 0,48 | 1,66 | 1,04 | 0,72 | 2,52 |
| **Aromatski esteri** | 0,44 | 0,11 | 0,29 | 0,32 | 0,07 | 0,22 | 0,62 | 0,23 | 0,29 | 0,16 | 0,12 | 0,35 |
| **Ostalo** | 1,34 | 1,51 | 1,99 | 2,46 | 2,19 | 1,70 | 2,83 | 1,62 | 3,13 | 1,69 | 1,29 | 3,03 |
| **Ukupno identificirano** | 96,81 | 99,26 | 99,38 | 98,62 | 99,17 | 92,01 | 98,22 | 98,98 | 98,64 | 98,71 | 98,76 | 97,44 |

B- lokacija Barbariga; L- lokacija Lun; H- lokacija Hvar; VL- lokacija Vela Luka
1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

U *Tablici 24* prikazane su vrijednosti udjela osam kemijskim skupina identificiranih u uzorcima eteričnih ulja lista tršlje dobivenim iz lista tršlje koji su ubrani sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka tijekom 3 fenološke faze tršlje. Kvalitativni profili svih dobivenih uzoraka eteričnih ulja lista tršlje su okarakterizirani najvećim udjelima monoterpena (52,10 - 76,67 %) u

koje pripadaju određene glavne sastavnice eteričnog ulja lista tršlje kao što su α-pinen, limonen i β-pinen. Kemijska skupina seskviterpena, s glavnim sastavnicama germakrenom D, α-murolenom, δ-kadinenom, je druga najzastupljenija kemijska skupina (9,53 - 31,94 %). Zrira i sur. (2003), Douissa i sur. (2005) i Gardeli i sur. (2008) istraživanjem sastava eteričnih ulja lista tršlje porijeklom iz Maroka, Tunisa i Grčke također određuju glavne kemijske skupine kao monoterpene i seskviterpene, što su potvrdili i El-Sherei i sur. (2014). Ostale kvantificirane kemijske skupine su monoterpenski alkoholi (9,53 - 31,94 %), seskviterpenski alkoholi (0,88 - 4,54 %), alifatski esteri (0,48 - 2,57 %), monoterpenski esteri (0,29 - 2,16 %), aromatski esteri (0,11 - 0,62 %) i monoterpenski oksidi (0,05 - 0,29 %).

Najveći udjel monoterpena (76,67 %) je određen u eteričnom ulju dobivenom iz lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar tijekom FF 2, a najniži u eteričnom ulju tršlje dobivenom iz lista tršlje ubranim sa lokacije Vela Luka tijekom FF 3 (52,11 %). U eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Lun, Hvar i Vela Luka, najveći udjeli su određeni tijekom FF 2 (67,32 %, 76,67 %, 69,65 %), dok u eteričnom ulju dobivenom iz uzorka tršlje ubranim sa lokacije Barbariga najveći udjel je određen tijekom FF 3 (71,90 %). Najniži udjeli monoterpena tijekom FF 1, su određeni u eteričnom ulju dobivenom iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacija Barbariga i Lun (54,67 %, 56,99 %), a u eteričnim uljima dobivenim iz lista tršlje ubranim sa lokacija Hvar i Vela Luka tijekom FF 3 (57,40 %, 52,11 %). Varijacije u udjelima monoterpena se mogu pripisati značajnoj varijabilnosti mircena tijekom fenoloških faza različitih lokacija.

***Tablica 25.*** Utjecaj lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) na masene udjele kemijskih skupina eteričnog ulja tršlje

| L | N | Monoterpeni | Monoterpenski alkoholi | Monoterpenski oksidi | Monoterpenski esteri | Seskviterpeni | Seskviterpenski alkoholi | Alifatski esteri | Aromatski esteri | Ostalo | Ukupno identificirano |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 9 | 63,49±0,01$^{b}$ | 6,26±0,08$^{b}$ | 0,02±0,00$^{b}$ | 0,69±0,03$^{b}$ | 22,61±0,06$^{c}$ | 2,30±0,04$^{b}$ | 0,99±0,04$^{a}$ | 0,29±0,01$^{b}$ | 1,61±0,04$^{a}$ | 98,26±0,15$^{b}$ |
| **2** | 9 | 63,41±0,01$^{b}$ | 8,16±0,08$^{c}$ | 0,00±0,00$^{a}$ | 0,44±0,03$^{a}$ | 18,75±0,06$^{b}$ | 2,20±0,04$^{b}$ | 1,29±0,04$^{b}$ | 0,20±0,01$^{a}$ | 2,12±0,04$^{b}$ | 96,58±0,15$^{a}$ |
| **3** | 9 | 66,48±0,01$^{c}$ | 9,36±0,08$^{d}$ | 0,09±0,00$^{c}$ | 1,13±0,03$^{c}$ | 15,43±0,06$^{a}$ | 1,48±0,04$^{a}$ | 1,59±0,04$^{d}$ | 0,39±0,01$^{c}$ | 2,55±0,04$^{c}$ | 98,50±0,15$^{a}$ |
| **4** | 9 | 59,74±0,01$^{a}$ | 5,85±0,08$^{a}$ | 0,00±0,00$^{a}$ | 1,77±0,03$^{d}$ | 25,04±0,06$^{d}$ | 2,16±0,04$^{b}$ | 1,44±0,04$^{c}$ | 0,21±0,01$^{a}$ | 2,12±0,04$^{b}$ | 98,33±0,15$^{a}$ |

L- lokacija; N-broj ponavljanja
1- lokacija Barbariga; 2- lokacija Lun; 3- lokacija Hvar; 4- lokacija Vela Luka

***Tablica 26.*** Utjecaj fenološke faze na masene udjele kemijskih skupina eteričnog ulja tršlje

| FF | N | Monoterpeni | Monoterpenski alkoholi | Monoterpenski oksidi | Monoterpenski esteri | Seskviterpeni | Seskviterpenski alkoholi | Alifatski esteri | Aromatski esteri | Ostalo | Ukupno identificirano |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 12 | 57,80±0,09$^{a}$ | 6,17±0,07$^{a}$ | 0,07±0,00$^{c}$ | 1,27±0,03$^{c}$ | 25,55±0,05$^{b}$ | 3,25±0,03$^{c}$ | 1,54±0,03$^{b}$ | 0,40±0,01$^{c}$ | 2,10±0,04$^{b}$ | 98,16±0,13$^{b}$ |
| **2** | 12 | 69,39±0,09$^{c}$ | 7,24±0,07$^{b}$ | 0,00±0,00$^{a}$ | 0,76±0,03$^{a}$ | 17,93±0,05$^{a}$ | 0,93±0,03$^{a}$ | 0,81±0,03$^{a}$ | 0,13±0,01$^{a}$ | 1,66±0,04$^{a}$ | 98,85±0,13$^{c}$ |
| **3** | 12 | 62,65±0,09$^{b}$ | 8,82±0,07$^{c}$ | 0,01±0,00$^{b}$ | 1,00±0,03$^{b}$ | 17,89±0,05$^{a}$ | 1,93±0,03$^{b}$ | 1,62±0,03$^{b}$ | 0,28±0,01$^{b}$ | 2,54±0,04$^{c}$ | 96,74±0,13$^{a}$ |

FF- fenološka faza ; N-broj ponavljanja
1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

***Tablica 27.*** Kombinirani utjecaj fenološke faze i lokacije (Barbariga, Lun, Hvar, Vela Luka) na masene udjele kemijskih skupina eteričnog ulja tršlje

| Lokacija | Fenološka faza | N | Monoterpeni | Monoterpenski alkoholi | Monoterpenski oksidi | Monoterpenski esteri | Seskviterpeni | Seskviterpenski alkoholi | Alifatski esteri | Aromatski esteri | Ostalo | Ukupno identificirano |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 3 | 54,62±0,18$^{b}$ | 2,07±0,13$^{a}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 1,13±0,06$^{d}$ | 31,70±0,10$^{k}$ | 4,53±0,06$^{g}$ | 0,64±0,06$^{a}$ | 0,48±0,02$^{f}$ | 1,35±0,07$^{a}$ | 96,52±0,26$^{b}$ |
| 1 | 2 | 3 | 64,35±0,18$^{f}$ | 6,45±0,13$^{d}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 0,13±0,06$^{a}$ | 24,64±0,10$^{h}$ | 1,46±0,06$^{c}$ | 0,75±0,06$^{a}$ | 0,12±0,02$^{a}$ | 1,53±0,07$^{a,b}$ | 99,43±0,26$^{c,d}$ |
| 1 | 3 | 3 | 71,50±0,18$^{j}$ | 10,27±0,13$^{h}$ | 0,05±0,01$^{b}$ | 0,81±0,06$^{c}$ | 11,49±0,10$^{b}$ | 0,92±0,06$^{b}$ | 1,57±0,06$^{c,d}$ | 0,26±0,02$^{c,d}$ | 1,95±0,07$^{c,d}$ | 98,84±0,26$^{c,d}$ |
| 2 | 1 | 3 | 56,69±0,18$^{c}$ | 9,39±0,13$^{f}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 0,50±0,06$^{b}$ | 23,73±0,10$^{g}$ | 3,59±0,06$^{f}$ | 1,80±0,06$^{e}$ | 0,32±0,02$^{d,e}$ | 2,45±0,07$^{e,f}$ | 98,48±0,26$^{c,d}$ |
| 2 | 2 | 3 | 67,30±0,18$^{h}$ | 9,31±0,13$^{f}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 0,28±0,06$^{a,b}$ | 18,28±0,10$^{e}$ | 0,53±0,06$^{a}$ | 1,32±0,06$^{b,c}$ | 0,07±0,02$^{a}$ | 2,21±0,07$^{d,e}$ | 99,30±0,26$^{c,d}$ |
| 2 | 3 | 3 | 66,22±0,18$^{g}$ | 5,79±0,13$^{d}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 0,54±0,06$^{b,c}$ | 14,23±0,10$^{c}$ | 2,48±0,06$^{d}$ | 0,75±0,06$^{a}$ | 0,23±0,02$^{b,c}$ | 1,71±0,07$^{a,b,c}$ | 91,96±0,26$^{a}$ |
| 3 | 1 | 3 | 62,52±0,18$^{e}$ | 9,57±0,13$^{f,g}$ | 0,28±0,01$^{c}$ | 1,23±0,06$^{d}$ | 17,36±0,10$^{d}$ | 1,76±0,06$^{c}$ | 2,65±0,06$^{e}$ | 0,64±0,02$^{g}$ | 2,81±0,07$^{f}$ | 98,82±0,26$^{c,d}$ |
| 3 | 2 | 3 | 76,46±0,18$^{k}$ | 8,43±0,13$^{e}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 0,82±0,06$^{c}$ | 9,38±0,10$^{a}$ | 0,93±0,06$^{b}$ | 0,46±0,06$^{a}$ | 0,23±0,02$^{b,c}$ | 1,54±0,07$^{a,b}$ | 98,25±0,26$^{c,d}$ |
| 3 | 3 | 3 | 60,45±0,18$^{d}$ | 10,09±0,13$^{g,h}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 1,35±0,06$^{d}$ | 19,54±0,10$^{f}$ | 1,76±0,06$^{c}$ | 1,65±0,06$^{d}$ | 0,29±0,02$^{c,d,e}$ | 3,29±0,07$^{g}$ | 98,42±0,26$^{c,d}$ |
| 4 | 1 | 3 | 57,38±0,18$^{c}$ | 3,67±0,13$^{b}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 2,21±0,06$^{f}$ | 29,39±0,10$^{j}$ | 3,14±0,06$^{e}$ | 1,09±0,06$^{b}$ | 0,15±0,02$^{a,b}$ | 1,78±0,07$^{b,c}$ | 98,81±0,26$^{c,d}$ |
| 4 | 2 | 3 | 69,43±0,18$^{i}$ | 4,76±0,13$^{c}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 1,81±0,06$^{e}$ | 19,42±0,10$^{f}$ | 0,80±0,06$^{a,b}$ | 0,73±0,06$^{a}$ | 0,12±0,02$^{a}$ | 1,37±0,07$^{a}$ | 98,43±0,26$^{c,d}$ |
| 4 | 3 | 3 | 52,41±0,18$^{a}$ | 9,12±0,13$^{f}$ | 0,00±0,01$^{a}$ | 1,29±0,06$^{d}$ | 26,32±0,10$^{i}$ | 2,55±0,06$^{d}$ | 2,50±0,06$^{e}$ | 0,35±0,02$^{e}$ | 3,19±0,07$^{g}$ | 97,74±0,26$^{b,c}$ |

N- broj ponavljanja

1- lokacija Barbariga; 2- lokacija Lun; 3- lokacija Hvar; 4- lokacija Vela Luka

1 – faza cvjetanja (svibanj, 2019); 2 – faza ranog plod (kolovoz, 2019); 3 – faza zrelog ploda (listopad, 2019)

Prema rezultatima statističke analize, pokazalo se da pojedinačno lokacija i fenološka faza (*Tablice 25 i 26*), ali i njihovo kombinirano djelovanje (*Tablica 27*) imaju značajan utjecaj na udjele kemijskih skupina eteričnih ulja lista tršlje. Zrira i sur. (2003) su dokazali da je kemovarijabilnost eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Maroka posljedica utjecaja sezone i lokacije branja, što su potvrdili i Sgarbossa i sur. (2019) istraživanjem sastava eteričnog ulja *Aloysia triphylla*.

Izračunati statistički podaci ovisnosti kemijskih skupina eteričnog ulja tršlje o lokaciji (*Tablica 25*), su pokazali da je najveći prinos monoterpena (66,48 ± 0,01 %), monoterpenskih alkohola (9,36 ± 0,08 %), alifatskih estera (1,59 ± 0,04 %) i aromatskih estera (0,39 ± 0,01 %), određeni u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar. Najveći udjeli monoterpenskih estera (1,77 ± 0,03 %) i seskviterpena (25,04 ± 0,06 %) su određeni u eteričnim ulju dobivenom iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Vela Luka. Seskviterpenski alkoholi su u najvećim udjelima određeni u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Barbariga (2,30 ± 0,04 %) i Luna (2,20 ± 0,04 %), između kojih nije bilo značajne statističke razlike. Prema udjelima monoterpena, ponavlja se trend grupiranja prema lokaciji, Barbariga i Lun između kojih nema značajne statističke razlike, te Hvar i Vela Luka, što je posljedica sličnih klimatskih uvjeta. Naime, prosječne oborine (mm) izmjerene na lokacijama Barbariga i Lun su tijekom 2019. godine za 2,45 puta veće od prosječnih oborina izmjerenih na lokacijama Hvar i Vela Luka. Prema istraživanju koje su proveli Boira i Blanquer (1998), porast monoterpena u biljci *Thymus piperella* L. je posljedica sušnih razdoblja tj. nedostatka vode.

Iz *Tablice 26* u kojoj je prikazani statistički podaci utjecaja vremena fenološke faze na pojedine grupe kemijskih spojeva o fenološkoj fazi, može se zaključiti da najveći udjeli monoterpena (69,39 ± 0,09 %) su određeni tijekom FF 2, monoterpenskih alkohola tijekom FF 3 (8,82 ± 0,07 %), dok tijekom FF 1 određeni su najveći udjeli monoterpenskih estera (1,27 ± 0,03 %), seskviterpena (25,55 ± 0,05 %), seksviterpenskih alkohola (3,25 ± 0,03 %), alifatskih i aromatskih estera (1,54 ± 0,03 % i 0,40 ± 0,01 %). Između FF 2 i 3 nije bilo značajne statističke razlike u udjelima seskviterpena (17,93 ± 0,05 % odnosno 17,89 ± 0,05 %).

Kombinirani utjecaj lokacije i fenološke faze na udjele kemijskih skupina eteričnih ulja lista tršlje je vidljiv iz rezultata koji su prikazani u *Tablici 27***.** Iz rezultata vidljivo su da najveći udjeli monoterpena u eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Lun, Hvar i Vela Luka postignuti tijekom FF 2 (67,30 ± 30 %, 76,46 ± 46 %, 69,43 ± 0,18 %), dok je najveći udjel monoterpena eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Barbariga

određen tijekom FF 3 (71,50 ± 0,18 %). Najveći udjeli monoterpena eteričnih ulja se ne poklapaju s FF 1 tijekom koje su dobiveni najveći prinosi eteričnih ulja što je u skladu s istraživanjem Chagas i sur., (2011) koji su zaključili da sinteza eteričnih ulja nije uvjetovana fazom tijekom koje biljka postiže najveću biomasu već količinom stresa kojoj je biljka izložena. Iz tablice je također vidljivo da tijekom sinteze monoterpena, u uzorcima lista tršlje ubranima sa lokacija Lun, Hvar i Vela Luka, ne dolazi do sinteze ostalih kemijskih skupina.

Sinteza seksviterpena u najviše uzoraka eteričnog ulja lista tršlje odvijala se tijekom FF 1 (Barbariga, Lun i Vela Luka), dok su najveći udjeli seskviterpena za eterično ulje dobiveno iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Hvar određeni tijekom FF 3. Udjeli seskviterpenskih alkohola su pratili trend sinteze seskviterpena koja se odvijala tijekom FF 1, s najvećim udjelom određenim u uzorcima eteričnih ulja dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (4,53 ± 0,06 %), potom iz Luna (3,59 ± 0,06 %), Vela Luke (3,14 ± 0,06 %) i Hvara (1,76 ± 0,06 %). U eteričnim uljima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranih sa lokacije Hvar, između FF 1 (1,76 ± 0,06 %) i 3 (1,76 ± 0,06 %), nije bilo značajne statističke razlike. Najveći udjeli monoterpenskih alkohola su određeni tijekom FF 3 u uzorcima eteričnih ulja dobivenih iz lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga (10,27 ± 0,13 %), Hvar (10,09 ± 0,13 %) i Vele Luke (9,12 ± 0,13 %), dok u uzorcima dobivenim iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun najveći udjeli su određeni tijekom FF 1 (9,39 ± 0,13 %) i 2 (9,31 ± 0,13 %) jer između njih nije bilo značajne statističke razlike.

### 4.5. Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja lista tršlje

Eterična ulja izolirana iz aromatičnog bilja su sekundarni metaboliti karakteristični po niskoj toksičnosti zbog čega se koriste u prehrambenoj industriji kao dodaci prehrani, arome i konzervansi, a od nedavno se sve više istražuju kao potencijalni prirodni agensi za kontrolu nametnika zbog insekticidnog, repelentnog i herbicidnog djelovanja kako bi zamijenili sintetičke pesticide čije djelovanje je štetno za ljudski organizam (Isman, 2006; Nerio i sur., 2010; Conti i sur., 2010, 2011; Benelli i sur., 2012). Osim u prehrambenoj i agro-kemijskoj industriji, primjena eteričnih ulja kao prirodnih antimikrobnih agensa je sve više istraživana u farmaceutskoj industriji.

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja lista tršlje ispitana je primjenom disk difuzijske metode kojom se određuje osjetljivost odabranih sojeva mikroorganizma na antimikrobne agense prema principu radijalne difuzije mikrobnog agensa kroz agar pri čemu nastaje gradijent koncentracije.

***Tablica 28.*** Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja lista tršlje dobivenih parnom destilacijom pri optimalnim uvjetima iz uzoraka s 4 lokacije branim tijekom 3 fenološke faze određena disk-difuzijskom metodom prema gram negativnim bakterijama *E. coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED

| Lokacija | Fenološka faza | *Escherichia coli* soj AB1157 *Zona inhibicije* (mm) | *Erwinia amylovora* soj EaED *Zona inhibicije* (mm) |
|---|---|---|---|
| **Barbariga** | 1 | 0,41 | 0,43 |
| | 2 | 0,43 | 0,86 |
| | 3 | 0,91 | 1,29 |
| **Lun** | 1 | 0,52 | 1,29 |
| | 2 | 0,95 | 0,89 |
| | 3 | 0,24 | 0,41 |
| **Hvar** | 1 | 0,58 | 1,29 |
| | 2 | 1,33 | 2,15 |
| | 3 | 0,43 | 0,86 |
| **Vela Luka** | 1 | 0,51 | 0,43 |
| | 2 | 1,21 | 0,89 |
| | 3 | 0,43 | 1,29 |

Promjer diska je iznosio 6 mm i njegov promjer nije dio izmjerenih inhibicijskih zona. Prezentirani rezultati (*Tablica 28*) ukazuju da su svi uzorci eteričnih ulja pokazali inhibitorni učinak prema rastu bakterija *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED, te da je antibiotik kloramfenikol najučinkovitiji u inhibiranju rasta odabranih sojeva bakterija. Vidljivo je da izrazitiji inhibicijski učinak eterično ulje lista tršlje ima na bakteriju *Erwinia amylovora* soj EaED u odnosu na *Escherichia coli* soj AB1157.

Kloramfenikol, antibiotik koji je upotrijebljen kao pozitivna kontrola, ostvario je zone inhibicije od 5,15 mm na bakteriju *Escherichia coli* soj AB1157 i 11,37 mm na bakteriju *Erwinia amylovora* soj EaED. U usporedbi s kontrolnim antibiotikom, eterična ulja lista tršlje dobivena iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka tijekom 3 fenološke faze su pokazala umjereno antimikrobno djelovanje prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED.

Antimikrobni učinak eteričnih ulja lista tršlje na odabrane mikroorganizme je dokazan izmjerenim promjerima zone inhibicije u rasponu od 0,24 mm do 1,33 mm na *E. coli* soj AB1157, te 0,414 do 2,15 mm na *E. amylovoru* soj EaED (*Tablica 28*). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je inhibicijska aktivnost testirana na oba mikroorganizma varirala ovisno o lokaciji i fenološkoj fazi tršlje. Uspoređujući vrijednosti izračunatih zona inhibicije, može se zaključiti da su primijenjena eterična ulja lista tršlje imala sličan inhibitorni učinak na oba soja gram - negativnih bakterija (*E. coli* soj AB1157 i *E. amylovoru* soj EaED).

Najveća izmjerena zona inhibicije kod *E. coli* soj AB1157 je iznosila 1,33 mm, a za *E. amylovoru* soj EaED 2,15 mm, obje dobivene tijekom FF 2 inhibicijskom aktivnošću eteričnih ulja tršlje porijeklom sa Hvara u kojima su određeni najveći udjeli α-pinena (23,88 %), β-pinena (11,88 %) i limonena (12,45 %). Najmanje vrijednosti od 0,24 mm i 0,41 mm za *E. coli* soj AB1157 i *E. amylovoru* soj EaED izmjerene tijekom FF 3 antimikrobnom aktivnošću eteričnog ulja lista tršlje dobivenim iz uzoraka tršlje ubranim sa lokacije Lun u kojima su određeni jedni od najnižih udjela α-pinena (11,70 %) i sabinena (2,25 %). Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja lista tršlje na bakteriji *E. coli* disk difuzijskom metodom, Gkogka i sur., (2013) su izmjerili zonu inhibicije u iznosu od 10 mm. Prema rezultatima od Mharti i sur. (2011), eterično ulje lista tršlje je pokazalo jaku antimikrobnu aktivnost prema gram-negativnoj bakteriji *Klebsiella pneumoniae* s izmjerenom zonom inhibicije od 16 mm i jače djelovanje od antibiotika levofloksacina i amipicilina, ali bez postignute aktivnosti prema *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimikrobni utjecaj eteričnih ulja je posljedica njihovog sastava, točnije udjela sastavnica kemijskih grupa. Kemijske skupine eteričnih ulja kao što su monoterpeni i seskviterpeni mircen, α-pinen, limonen i germakren D, posjeduju citotoksična svojstva prema različitim mikroorganizmima (Cole i sur., 2007; Abdallah i Ezzat, 2011; Salvador i sur., 2011; Satya i sur., 2012). Istraživanje koje su proveli Knobloch i sur., (1989), dokazalo je da monoterpeni, α- i β-pinen, iskazuju umjereni do jaki inhibitorni učinak na mikroorganizme što su potvrdila i ostala dostupna istraživanja (Hajji i sur., 1993; Derwich i sur., 2010). Nadalje, istraživanje koje su proveli Alessandra i sur. (1999), je dokazalo da α-terpineol iz eteričnog ulja lista tršlje pokazuje inhibitorni učinak prema bakteriji *E. coli*. Haloui i sur. (2015) su dokazali da eterično ulje lista tršlje zbog visokih udjela α-pinena, germakrena D iskazuje inhibitornu aktivnost prema *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli*.

Antimikrobnu aktivnost je vrlo teško povezati s specifičnom spojem zbog njihove kompleksnosti (Mélanie i sur., 2012), te se prema dostupnim istraživanjima antimikrobne učinkovitosti kemijskih grupa eteričnih ulja i pojedinih sastavnica može zaključiti da je antimikrobna aktivnost eteričnih ulja svih testiranih uzoraka posljedica sinergističkog djelovanja sastavnica eteričnog ulja. Sinergističko djelovanje sastavnica eteričnog ulja lista tršlje porijeklom iz Grčke prema bakterijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* su dokazali Koutsoudaki i sur. (2005). U njihovom istraživanju ispitivan je inhibitorni učinak eteričnog ulja lista tršlje i zasebnih glavnih sastavnica (α-pinen, β-mircen, β-pinen) prema navedenim bakterijama. Eterično ulje lista tršlje je pokazalo antimikrobnu aktivnost prema svim bakterijama s izmjerenim zona inhibicje od 12,00 mm, 18,50 mm i 17,00 mm na bakterije *E. coli*, *S. aureus* i *B. subtilis*. Nadalje, rezultati njihovog ispitivanja antimikrobnog djelovanja glavnih pojedinačnih sastavnica α-pinena, β-mircena i β-pinena na bakterije *E. coli* i *S. aureus* ne pokazuje antimikrobnu aktivnosti, te da je bakterija *B. subtilis* rezistentana prema djelovanju α-pinena ali ne i β-mircena i β-pinena. Zaključili su da antimikrobno djelovanje eteričnog ulja lista tršlje nije posljedica inhibitornog učinka glavnih sastavnica, nego međusobnog međudjelovanja sastavnica ulja s velikim udjelima i onih kojih su detektirani u tragovima.

Međutim, disk difuzijskom metodom nije moguće odrediti djeluje li spoj mikrobiocidno ili mikrobiostatički, pa je potrebno provesti daljnja istraživanja određivanja minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije eteričnog ulja lista tršlje.

Provedeno antimikrobno istraživanje je dokazalo da eterično ulje lista tršlje ima značajan inhibitorni učinak na obje gram negativne bakterije, te da ima jači inhibitorni učinak iskazan prema bakteriji *E. amylovoru* soj EaED.

# *5. ZAKLJUČCI*

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

1. Optimalni uvjeti za provođenje ekstrakcije BAM-a iz lista tršlje postupkom konvencionalne ekstrakcije su vrijeme trajanja ekstrakcije od 90 min i upotreba 80 % vodene otopine metanola kao otapala, pri kojima se dobiva najveći maseni udio ukupnih fenola u iznosu od 73,156 mg GAE/g.
2. Upotreba 80 % vodene otopine metanola, temperatura od 76 °C, snaga mikrovalova 602 W i vrijeme ekstrakcije od 12 min su se pokazali kao optimalni uvjeti za postizanje najvećih masenih udjela BAM-a primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.
3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima se pokazala izrazito efikasnom za izolaciju ukupnih fenola iz lista tršlje zbog visokog ekstrakcijskog prinosa i kraćeg vremena u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom.
4. U ekstraktima tršlje dobivenim pri optimalnim uvjetima kvalitativnom i kvantitativnom analizom pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom HPLC - UV/Vis PDA te LC-MS/MS-a u identificirano je ukupno 33 fenolna spoja (5 hidroksibenzojevih kiselina, 5 hidroksicimetnih kiselina, 6 flavanola, 15 flavonola i 2 flavona). U najvećim koncentracijama su određeni derivati galne kiseline, derivati miricetina i derivati kvercetina.
5. Abiotički faktori kao što su lokacija i fenološka faza biljke su značajno utjecale na masene koncentracije fenolnih spojeva u ektraktima lista tršlje. U ovisnosti o lokaciji i fenološkoj fazi, najveće masene koncentracije UFK i UFG su određene iz uzoraka lista tršlje ubranim sa iste lokacije Hvar tijekom fenološke faze 1 odnosno 2. Najniže masene koncentracije UFK i UFG također su određene iz uzoraka ubranim sa iste lokacije Lun ali tijekom fenološke faze 3 odnosno fenološke faze 1.
6. Osim za biljne ekstrakte, list tršlje se pokazao kao pogodan materijal za izolaciju eteričnog ulja iako je istraživanje pokazalo da su prinosi vrlo niski. Najveći prinos eteričnog ulja lista tršlje dobiven je parnom destilacijom uzoraka tršlje ubranim tijekom fenološke faze 1 sa lokacije Vela Luka (0,767 ± 0,02 %), najniži tijekom fenološke faze 2 iz uzoraka lista tršlje ubranim sa lokacije Lun (0,117 ± 0,03 %).
7. Unatoč malim prinosima, GC-MS analizom identificirano je 56 sastavnica koje predstavljaju 99,19 – 100 % ukupnog sastava eteričnog ulja lista tršlje, a u kojem

dominiraju monoterpeni. Od glavnih sastavnica identificirani su α-pinen (9,19 - 23,88 %), limonen (6,38 - 12,45 %) i β-pinen (2,43 - 12,17 %).

8. Svi uzorci eteričnih ulja lista tršlje su pokazali inhibitorni učinak prema gram-negativnim bakterijama *E. coli* soj AB1157 i *E. amylovori* soj EaED. Antimikrobna aktivnost je dokazana izmjerenim promjerima zone inhibicije od 0,24 mm do 1,33 mm za *E. coli* soj AB1157, te od 0,41 do 2,15 mm za *E. amylovoru* soj EaED. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja svih testiranih uzoraka posljedica sinergističkog djelovanja sastavnica eteričnog ulja ali i uvjeta okoline.
9. Zbog utvrđenog visokog udjela bioaktivnih molekula, ekstrakti i eterična ulja dobivena iz lista tršlje se smatraju visokovrijednim supstratima koji imaju potencijal u farmaceutskim proizvodima ili kao hrana s dodanom vrijednošću.

# *6. LITERATURA*

1. Abdallah, H.M., Ezzat S.M.Z. (2011) Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. *Z. Naturforsch C.,* **66**, 143-148.
2. Adams, R.P. (2001) Identification of essential oil components by Gas Chromatograph/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp., Carol Stream.
3. Ait Said, S., Torre, F., Derridj, A., Gauquelin, T., Mevy, J.P. (2013) Gender, mediterranean drought, and seasonality: photosystem II photochemistry in *Pistacia lentiscus* L. *Photosynthetica,* **51** (4), 552-564.
4. Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., Ullah, M. O. (2016) Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism,* **13** (1).
5. Alavi-Samani, S.M., Pirbalouti, A.G., Kachouei, M.A., Hamdi, B. (2013) The influence of reduced irrigation on herbage, essential oil yield and quality of *Thymus vulgaris* and *Thymus daenensis*. *J. Herbal Drugs*, **4**, 109–113.
6. AL-Farsi, M.A. and Lee, C.Y. (2007) Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. *J Food Chem*., **108**, 977-985.
7. Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P.J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T.A., Kleine, H.P., Knight, C., Nagy, M.A., Perry, D.A., Stefaniak, M. (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem.*, **10**, 31–36.
8. Al-Marazeeq, K., Haddadin, M. S. Y., Abdulla, B., Haddadin, J.S. (2016) Biological activities of olive leaves extract from nabali baladi variety against lipid and protein oxidation. *Int. J. Biol. Biotech*., **13** (2), 283-291.
9. Altiok, E., Bayçin, D., Bayraktar, O., Ülkü, S. (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, **62**, 342-348.
10. Amić, D., Lučić, B. (2010) Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **18**, 28–35.

11. Aouinti, F., Imelouane, B., Tahri, M., Wathelet, J. P., Amhamdi, H., Elbachiri, A. (2013) New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Research on Chemical Intermediates*, **40** (8), 2873–2886.
12. Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014) Phytochemical and evaluation of the antimicrobial and antioxydant activity of essentials oils and phenolic pompouds of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Fundamental and Aplied Sciences*, **6** (1), 79-93.
13. Azaizeh, H., Halahleh, F., Abbas, N., Markovics, A., Muklada, H., Ungard, ED., *et al*. (2013) Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Vet Parasitol*, **191**, 44–50.
14. Babu, K. G. D., Singh, B., Joshi, V. P., Singh, V. (2002) Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Flavour and Fragrance Journal*, **17** (2), 136–140.
15. Bachrouch, O., Msaada, K., Wannes, W. A., Talou, T., Ksouri, R., Salem, N., Abderraba, M., Marzouk B. (2015) Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. *Plant Biosystems*, **149**, 38 – 47.
16. Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M., Bagher Rezaii, M. (2002) The influence of waterstress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour Frag. J*., **17**, 275–277.
17. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46** (2), 446-475.
18. Ballard, S.T., Malikarjunan, P., Zhou, K., O'Keffe, S. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem*., **120**, 1185-1192.
19. Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Nektarios, A., Krokida, M., Magoulas, K. (2014) Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS. *Journal of Food Engineering*, **167**, 25-31.
20. Baral, S., Pariyar, R., Kim, J., Lee, H.S., Seo, J. (2017) Quercetin-3-O-glucuronide promotes the proliferation and migration of neural stem cells. *Neurobiolgy of Aging*, **52**, 39-52.

21. Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R., Pogni, R. (2003) Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radic Res*., **37** (4), 405–412.
22. Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A. (2007) Characterization of the volatile constituents in the essential oil of Pistacia lentiscus L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*., **55**, 7093–7098.
23. Barros, L., Tiago Alves, C., Duenas, M., Silvac, S., Oliveirac, R., Carvalhoa, A.M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013) Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Ind Crops Prod*., **44,** 104–110.
24. Bartnick, DD, Mohlerm C.M., Houlihan, M. (2006) Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application, 20060088627.
25. Baslam, M., Goicoechea, N. (2011) Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza*., **22**, 347–359.
26. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*., **45**, 493–496.
27. Beghlal, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L., Mohamed, B. (2016) Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.) *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **6**, 305-310.
*28.* Belhachat, D., Aid, F., Mekimenea, L., Belhachat., M. (2017) Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* berries ethanolic extract growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **10**, 273–285.
29. Ben Farhat, M., Jordán, M. J., Chaouch-Hamada, R., Landoulsi, A., Sotomayor, J. A. (2016) Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis* L.) yield and composition of essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **3**(3), 87–93.
30. Ben Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K., Marzouk, B. (2010) Changes in fatty acid andessential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chem*., **119**, 951–956.

31. Benelli, G., Flamini, G., Canale, A., Cioni, P.L., Molfetta, I., Conti, B. (2012) Repellence of *Hyptis suaveolens* whole essential oil and major constituents against adults ofthe granary weevil *Sitophilus granarius*. *Bull. Insectol*., **65**, 177–183.
32. Benhammou, N., Atik-Bekkara F. and T. Kadifkova-Panovska, T. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afric. J. Pharm. Pharmacol*., **2** (2), 22–28.
33. Bhebhe, M., Fuller, T.N., Chipurura, B., Muchuweti, M. (2016) Effect of Solvent Type on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of Black Tea and Herbal Infusions. *Food Anal Method*., **9** (4):1060-7.
34. Bhouri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M., *et al*. (2010) Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*, **24**, 509–15.
35. Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, **89**, 67-72.
36. Boelens, M.H., Jimenez, R. (1991) Chemical compostion of the essential oils from the gum and various parts of *Pistacia lentiscus. Flavour Fragr. J.*, **6**, 271–275.
37. Boira, H., Blanquer, A. (1998) Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochem. Syst. Ecol*., **26**, 811–822.
38. Boudieb, K., Ait Slimane-Ait Kaki, S., & Amellal-Chibane, H. (2019) Effect of Maturation Degree on the Fixed Oil Chemical Composition, Phenolic Compounds, Mineral Nutrients and Antioxidant Properties of *Pistacia lentiscus* L. Fruits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **47** (3).
39. Bougherra, H.H., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., Conti, B. (2015) *Pistacia lentiscus* essential oil has repellent effect against three majorinsect pests of pasta. *Industrial Crops and Products*, **63**, 249–255.
40. Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R. (2013) Five Pistacia species (*P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk,* and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal*, **2013**, 1-33.

41. Bravo, S., García-Alonso, J., Martín-Pozuelo, G., Gómez, V., Santaella, M., Navarro-González, I., Periago, M.J. (2012) The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, b-carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Res. Int.*, **49**, 296–302.
42. Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M. and Velic, D. (2007) Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng*., **81**, 236-242.
43. Buil, P., Garnero, J., Guichard, G. (1974) Contribution à la connaissance chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Oficin Aromi Saponi Cosmet. Aerosol*, **56**, 245–252.
44. Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223–53.
45. Butler, L.G. (1992) Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects. Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenols, str. 11-18.
46. Capellari, L.R., Santoro, M.V., Nievas, F., Giordano, W., Banchio, E. (2013) Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol*., **70**, 16–22.
47. Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014) *Castanea sativa* Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res Int.*,1-7.
48. Carson, C.F., Mee, B.J., Rilet, T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifoila* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**: 1914‑1920.
49. Carvalho, S., Macel, M., Mulder, P.P., Skidmore, A., Putten, W.H. (2014) A variação química em *Jacobaea vulgaris* é influenciada pela interação do estágio sucessional da estação e da vegetação. *Phytochemistry*, **99**, 86–94.
50. Castelo, A.V.M., Del Menezzi, C.H.S., Resck, I.S. (2012) Seasonal Variation in the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils from Two Brazilian Native Arbustive Species. *Journal of Applied Sciences*, **12**, 753-760.
51. Castola, V., Bighelli, A., Casanova, J. **(**2000) Intraspecic chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 79-88.

52. Chagas, J.H., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Santos F.M. (2011) Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. *Acta Scientiarum Agronomy*, **33**, 327-334.
53. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, **10**, 178-182.
54. Chanioti, S., Tzia, C. (2018) Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* **48**, 228–239.
55. Cheel, J., Tůmová, L., Areche, C., Van Antwerpen, P., Nève, J., Zouaoui-Boudjeltia, K., San Martin, A., Vokřál, Wsól, V., I., Neugebauerová, J. (2012) Variations in the chemical profile and biological activities of licorice *(Glycyrrhiza glabra* L.*)*, as influenced by harvest times. *Acta Physiologiae Plantarum,* **35** (4), 1337–1349.
56. Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K., El-Adawi, H. (2012) Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves Algerian *Pistacia lentiscus*. *Asian Journal of Plant Sciences,* **11** (3), 131-136.
57. Chikezie, P.C., Ibegbulem, C.O., Mbagwu, F.N. (2015) Bioactive principles from medicinal plants. *Res J Phytochem,* **9**, 88–115.
58. Chithrashree-Udayashankar, A.C., Chandra-Nayaka, S., Reddy, M.S., Srinivas, C. (2011) Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae. *Biol. Control*., **59**, 114–122.
59. Chouaibi, M., Gaout, N., Hamdi, S., Daoued, K.B., Bel Haj, O. (2015) Chemical composition and antioxidant activities of cold pressed lentisc (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, **93** (1).
60. Cisse, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M. and Dornier, M. (2012) Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: experimental kinetics and modeling. *J Food Eng.*, **109**, 16-21.
61. Clifford, M.N., Scalbert, A. (200) Review ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1118–25.

62. Cole, R.A., Bansal, A., Moriarity, D.M., Haber, W.A., Setzer, W.N. (2007) Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, *Costa Rica J. Nat. Med.*, **61**, 414-417.
63. Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S. (2002) Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO2. *Flavour Fragr. J*., **17** (4), 239–244.
64. Conti, B., Canale, A., Cioni, P.L., Flamini, G. (2010) Repellence of essential oils fromtropical and Mediterranean Lamiaceae against *Sitophilus zeamais*. *Bull. Insectol*., **63**, 197–202.
65. Conti, B., Canale, A., Cioni, P.L., Flamini, G., Rifici, A. (2011) *Hyptis suaveolens* and *Hyptisspicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity andrepellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). *J. Pest Sci*., **84**, 219–228.
66. Converti, A., Aliakbarian, B., Domínguez, J.M., Bustos Vázquez, G., Perego, P. (2010) Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, 519-530.
*67.* Cown, M.N. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews,* **12** (4), 564-582.
68. Cristiano, G., Camposeo, S., Fracchiolla, M., Vivaldi, G. A., De Lucia, B., Cazzato, E. (2016) Salinity Differentially Affects Growth and Ecophysiology of Two Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* L.) *Accessions. Forests*, **7**, 1 – 12.
69. Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*., **166**, 585-595.
70. Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014) *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind Crop Prod.* **61,** 31–40.
71. Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.
72. de Graft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., Nowak, D. (2007) Ferric-Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and Their Metabolites:

Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **100**, 345-352.

73. De Pooter, H.L., Schamp, N.M., Aboutalb, E.A,, El Tohamy, S.F., Doss, S.L. (1991) Essential oils from the leaves of tree pistacia species grown in Egypt. *Flavour Fragr. J.*, **6**, 229–232.
74. Dedoussis, G.V.Z., Kaliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadapoulos N.G. and Andrikopoulos, N.K. (2004) Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and down regulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, **174**, 293-303.
75. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, Bioavailability and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 1818-1892.
76. Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts, *Food. Technol. Biotech.,* **51** (1), 84.
77. Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., Boukir, A. (2010) GC/MS analysis and In vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocoo. *World Appl. Sci. J.,* **8** (10), 1267‑1276.
78. Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., Roncalés, P. (2011) Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control,* **22** (7), 1046-1053.
79. Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Phuong, L.T.N., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., *et al*. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal*., **22** (3), 296-302.
80. Douissa, F. B., Hayder, N., Ghedira, L. C., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M. (2005) New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 410‑414.

81. Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Technol Biotech.,* **50** (3), 377-383.
82. Drmić, H., Jambrak, R. A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2** (2), 22-33.
83. Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products,* **75,** 141–149.
84. Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Režek Jambrak, A., Jukić, M. (2013) The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). *J. Food Eng*., **117**, 437–42.
85. El-Sherei, M., Khaleel, A., Motaal, A. A., Abd-Elbaki, P. (2014) Effect of Seasonal Variation on the Composition of the Essential Oil of *Solidago canadensis* Cultivated in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants,* **17** (5), 891–898.
86. Erdman, J.W. Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J. (2007) Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31- June 1, 2005, Washington, DC. *J. Nutr,* **137**, 718-737.
87. Favretto, L. (2004) Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications, Milestone, Bergamo
88. Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, **108** (3), 1039-53.
89. Feijó, E. V. R. da S., de Oliveira, R. A., Costa, L. C. do B. (2014) Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **24** (5), 516–523.
90. Fernandes, V. F., de Almeida, L. B., Feijó, E. V. R. da S., Silva, D. da C., de Oliveira, R. A., Mielke, M. S., Costa, L. C. do B. (2013) Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum. Revista Brasileira de Farmacognosia*, **23** (3), 419–424.

91. Fernandez, A., Camacho, A., Fernandez, C., Altarejos, J. (2000) Composition of the essential oils from galls and aerial parts of *Pistacia lentiscus* L. *J. Essent. Oil. Res.*, **12** (1), 19–23.
92. Fischer, U.A., Carle, R. and Kammerer, D.R. (2013) Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chem*., **138**, 1800-1809.
93. Fleisher, Z., Fleisher, A. (1992) Volatiles of the mastic tree- *Pistacia lentiscus* L. Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part X. *J. Essent. Oil Res*., **4**, 663–665.
94. Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J Chrom A.*, **798**, 179–186.
95. Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. (2003) Antibacterial activities of phenolic benzaldehides and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, **66** (10), 1811-182.
96. Frost, C.J., Appel, H.M., Carlson, J.E., De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Schultz, J.C. (2007) Within-plant signaling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signaling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, **10**, 490‑498.
97. Furneri, P.M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., Bisignano, G. (2002) In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents,* **20** (4), 293-296.
98. Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G.A., Gekas, V. (2013) A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *Int J Food Prop.*, **16** (2), 382-96.
99. Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris T., Komaitis, M. (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.*, **107**, 1120– 1130.
100. Gkogka, E., Hazeleger, W. C., Posthumus, M. A., Beumer, R. R. (2013) The Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **16** (6), 714–729.

101. Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., Romano, A. (2013) The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, **43**, 465-471.
102. Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci.* **1**, 8–26.
103. Guyot, S., Marnet, N., Drilleau, J. (2001) Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 14-20.
104. Haas, I.C.D., Toaldo, I.M., Burin, V.M., Bordignon-Luiz, M.T. (2018) Extraction optimization for polyphenolic profiling and bioactive enrichment of extractives of non-pomace residue from grape processing. *Ind Crop Prod*., **112**, 593-601.
105. Hajji, F., Fkih-Tetouani, S., Tantaoui-Elaraki, A. (1993) Antimicrobial activity of twenty one Eucalyptus essential oils. *Fitoterapia*, L XIV., **1**, 71-78.
106. Haloui, T., Farah, A., Balouiri, M., Chraibi, M., Fadil, M., Fikri Benbrahim, K., Belrhiti Alaoui, A. **(**2015) Bacteriostatic and bactericidal profile of leaves and twigs essential oils of Moroccan *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* **5** (06), 050-053.
107. Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defence responses. *Plant Cell*, **8**, 1773–1791.
108. Hamrouni Sellami, I., Maamouri, E., Chahed, T., Aidi Wannes, W., Kchouk, M.E., Marzouk, I. (2009) Effect of the growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind. Crops Prod.*, **30**, 395–402.
109. Harbourne, N., Jacquier, J.C., O'Riordan, D. (2009) Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) for incorporation into beverages. *Food Chemistry*, **116**, 722-727.
110. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J. A., Hossain, M. S., Fujita, M. (2016) Soybean production and environmental stresses. *Environmental stresses in soybean production*, 61-102.
111. Hayder, N., Ammar, R.B., Abdelwahed, A., Kilani, S., Mahmoud, A., Chibani, J.B., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L. (2005)

Antibacterial and antimutagenic activitiy of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus*, *Toxicological & Environmental Chemistry*, **87** (4), 567-573.

112. Hazzoumi, Z., Moustakime, Y., Amrani Joutei, K. (2015) Variation in Yield and Composition of Essential Oil in Pelargonium sp During the Vegetative Stage. International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences (CEBS-2015) March 18-19, Dubai (UAE).
113. Heil, M., Silva Bueno, J.C. (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 5467‑5472.
114. Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr*., **83** (12), 1238-1247.
115. Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol*., **3**, 12.
116. Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **126**, 1821-1835.
117. Ismail, A., Lamia, H., Mohsen, H., Bassem, J. (2012) Chemical composition and herbicidal effects of *Pistacia lentiscus* L. essential oil against weeds. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **2** (4), 558-565.
118. Isman, M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol*. **51**, 45–66.
119. Jablonský, M., Ramajová, H., Ház, A., Sládková, A., Škulcová, A., Čížová, K. (2016) Comparison of Different Methods for Extraction from Lavender: Yield and Chemical Composition. *Key Engineering Materials*, **688**, 31–37.
120. Jafari, E., Ghanbarian, G., Bahmanzadegan, A. (2018) Essential oil composition of aerial parts of *Micromeria persica* Boiss. from Western of Shiraz, Iran. *Natural Product Research*, **32** (8), 991-996.
121. Jerković, I. (2008) Fitoterapeutski pripravci i spojevi s protutumorskim djelovanjem. Skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu.

122. Jordano, P. (1989) Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos*, **55**, 375-386.

123. Kafkas, S., Khodaeiaminjan, M., Guney, M., Kafkas, E. (2015) Identification of sex-linked SNP markers using RAD sequencing suggests ZW/ZZ sex determination in *Pistacia vera* L. *Bmc Genomics*, **16**.

124. Kapoor, R., Giri, B., Mukerji, K.G. (2002) Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L) to enhance the concentration and quality of essential oil. *J. Sci. Food Agr*. **82**, 339–342.

125. Karban, R., Shiojiri, K., Huntzinger, M., McCall, A.C. (2006) Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intraand interplant communication. *Ecology*, **87**, 922‑930.

126. Karban, R., Yang, L.H., Edwards, K.F. (2014) Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis. *Ecology Letters*, **17**, 44-52.

127. Karemu, C.K., Ndung'u, M.W., Githua, M. (2013) Evaluation of repellant effects of oils from selected Eucalyptus species against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). In: Proceedings of the First International Conference on Pesticidal Plants, 21–23 January, Nairobi, Kenya, 86.

128. Katalinić, V., Smole Možina, S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M. (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, **119**, 715-723.

129. Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Anal*. **13**, 105-113.

130. Kaur, T., Bhat, R., Vyas, D. (2016) Effect of contrasting climates on antioxidant and bioactive constituents in five medicinal herbs in Western Himalayas. *Journal of Mountain Science*, **13** (3), 484–492.

131. Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M., Saleh, N.A.M. (2000) The favonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Ecol*., **28**, 915-917.

132. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*., **55**, 279–290.

133. Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. Advanced Review. *Wires Comput. Mol. Sci.*, **2**, 128-149.
134. Knobloch, K., Pauli, A., Iberi, B., Wegand, H., Weis, N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil Res*., **1**, 119–128.
135. Kofidis, G., Bosabalidis, A., Moustakas, M. (2003) Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharm. Biol*., **42,** 360-366.
136. Kofidis, G., Bosabalidis, A.M. (2008) Effects of altitude and season on glandular hairsand leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. *Bot. Stud*., **49**, 363–372.
137. Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **64**, 923-933.
138. Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E. (2003) Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, **74**, 164-167.
139. Körner, C. (2007) The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 569-574.
140. Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. (2005) Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (20), 7681–7685.
141. Krešić, M. (2014) Idejni tehnološki projekt pogona za proizvodnju eteričnih ulja smilja i lavande. Završni rad, *Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru*.
142. Kusuma, H. S., Mahfud, M. (2016) Preliminary study: kinetics of oil extraction from sandalwood by microwave-assisted hydrodistillation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **128**, 012009.
143. Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J.M., Moutounet, M. (1999) Quantitative fractionation of grape proantocyanidins according to their degree of polymerization. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2719-2723.
144. Lacković, Z. (2001) Farmakološki antioksidansi. Oksidativi stres i djelotvornost antioksidansa. Priručnik Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet i Hrvatsko društvo farmakologa, Medicinska naklada, Zagreb, 85-104.

145. Lafka, T. I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, **104** (3), 1206-1214.

146. Lakušić, D., Ristić, M., Slavkovska, V., Lakušić, B. (2013) Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). *Nat Prod Commun*., **8** (1), 131-134.

147. Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V., Samiyappan, R. (2009) Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biol. Control*., **50**, 85–93.

148. Lemos, M.F., Lemos, M.F., Pacheco, H.P., Endringer, D.C., Scherer R. (2015) Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Ind Crop Prod.,* **70**, 41-7.

149. Li, J., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Yang, Y.-C., Li, S.-M., Li, Z.-N., Wink, M. (2010) Optimization of microwave assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoceras sorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*., **11**, 637–664.

150. Lingua, G., Bona, E., Manassero, P., Marsano, F., Todeschini, V., Cantamessa, S., Copetta, A., D'Agostino, G., Gamalero, E., Berta, G. (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. *Int. J. Mol. Sci*., **14**, 16207–16225.

151. Liu, R.H. (2004) International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 3479S-3485S.

152. Llorens-Molina, J.A., González, S.V., Martínez J.S. (2015) Essential oil composition of leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Valencia (Spain). *Nat. Volatiles & Essent. Oils,* **2** (4), 17-26.

153. Lo Presti, M., Sciarrone, D., Crupi, M.L., Costa, R., Ragusa, S., Dugo, G., Monedello, L. (2008) Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus L.* essential oil. *Flavour Fragr. J.,* **23,** 249–257.

154. Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007) Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innov Food Sci Emerg*, **8**, 360–364.

155. López-Lázaro, M. (2009) Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem*, **9**, 31–59.

156. Lovrić, V., Putnik, P., Kovačević, D. B., Jukić, M., & Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technil. Biotechnol*, ***55*** (2), 243.

157. Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Ye, X.Q. (2009) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrason. Sonochem*., **16**, 57–62.

158. Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

159. Macwan, S.R., Dabhi, B.K., Aparnathi, K.D., Prajapati, J.B. (2016) Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **5**, 885-901.

160. Maizi, Y., Meddah, B., Tir Touil Meddah, A., Gabaldon Hernandez, J.A. (2019) Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. growing in Mascara (North West of Algeria). *J Appl Biotechnol Rep*., **6** (4), 151-157.

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

162. Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., Pang, E. (2012) Abiotic stress responses in plants: Present and future. In: Ahmad, P., Prasad, M.N.V. (Eds.), Abiotic Stress Response in Plants. Metabolism, Productivity, and Sustainability. Springer, New York, NY.

163. Marone, P., Bono, L., Leone E., Bona, S., Caretto, E., Perversi, L. (2013) Bactericidal Activity of *Pistacia lentiscus* Mastic Gum Against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, **13** (6), 611-614.

164. Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarcay, S., Perrin, D., Gerardin, P., Atmani, D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J Food Drug Anal*., **24**, 653-669.

165. Meier, C., Mediavilla, V. (1998) Factors influencing the yield and the quality of hemp *(Cannabis sativa* L.) essential oil. *Journal of the International Hemp Association* **5** (1), 16-20.

166. Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F.M. (1980) Solvent extraction of antocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, **45**, 1099-1100.

167. Mezni, F., Khouja, M.L., Gregoire, S., Martine, L., Khaldi A., Berdeaux O. (2014) Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of *Pistacia lentiscus* edible oil. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, **28** (16), 1225-1230.

168. Mharti, F.Z., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. (2011) Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* Used in Moroccan Folkloric Medicine. *Natural Product Communications*, **6** (10), 1505-1506.

169. Mishra, B., Sangwan, R. S., Mishra, S., Jadaun, J. S., Sabir, F., Sangwan, N. S. (2014) Effect of cadmium stress on inductive enzymatic and nonenzymatic responses of ROS and sugar metabolism in multiple shoot cultures of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal). *Protoplasma*, **251** (5), 1031–1045.

170. Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410.

171. Mohammedelnour, A. A., Mirghani, M. E. S., Kabbashi, N. A., Alam, M. Z., Musa, K. H., Aminah Abdullah (2017) Effect of solvent types on phenolics content and antioxidant activities of *Acacia polyacantha* gum. *International Food Research Journal*, **24**, 369-377.

172. Monties B. (1989) Lignins, U: Methods in Plant Biochemistry, Dey P.M., Harborne J.B., (Eds.) Academic Press, London, UK, 113–157.

173. Muller, J. (1984) Significance of fossil pollen for angiosperm history. *Ann. Missouri Botanical Garden*, 71, 419-443.

174. Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523–1542.

175. Naghdi Badi H., Yazdani D., Sajed M.A., Nazari F. (2004) Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Ind. Crops Prod*., **19**, 231‑236.

176. Namdjoyan, S., Namdjoyan, S., Kermanian, H. (2012) Induction of phytochelatin and responses of antioxidants under cadmium stress in safflower (*Carthamus tinctorius*) seedlings. *Turk J Bot*, **36**, 495-502.

177. Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem*. **187**, 507-516.

178. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria – review. *Pharmaceuticals* **6**, 1451-1474.

179. Nchabeleng, L., Mudau, F. N., Mariga, I.K. (2012) Effects of chemical composition of wild bush tea (*Athrixia phylicoides* DC.) growing at locations differing in altitude, climate and edaphic factors. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6** (9), 1662-1666.

180. Negro, C., De Bellis, L., Miceli, A. (2014) Chemical composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* essential oil from Southern Italy (Apulia). *Journal of Essential Oil Research*, **27** (1), 23–29.

181. Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. (2010) Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour. Technol*., **101**, 372–378.

182. Nhu-Trang, T. T., Casabianca, H., Grenier-Loustalot, M. F. (2006) Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ-terpinene and *p*-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1132** (1–2), 219–227.

183. Noller, C.R. (1973) *Kemija organskih spojeva*. Tehnička knjiga, Zagreb

184. Ojimelukwe, P.C., Alder, C. (1999) Potential of zimtaldehyd, 4-allyl-anisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of confused flour beetle (*Tribolium confusum* J. d. V.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Pestic. Sci*., **72**, 81–86.

185. Oliveira, M.J., Campos, I.F.P., Oliveira, C.B.A., Santos, M.R., Souza, P.S., Santos, S.C., Seraphin, J.C,, Ferri P.H. (2005) Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochem. Syst. Ecol*., **33**, 275–285.

186. Osterc, G., Cunja, V., Mikulic-Petkovseka, M., Schmitzer, V., Stampar, F., Bavcon, J. (2014) Foliage identification of different autochtonous common cyclamen genotypes (*Cyclamen purpurascens* Mill.) using various biochemical parameters. *Sci Hortic*. **173**, 37–44.

187. Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Ramos-Vαzquez, P., Gómez-Contrera, F., Sanz, J. (1999) Essential oil of *Santolina rosmarinifolla* L. ssp. rosmarlnifolia: first isolation of capillene, a dlacetylene derivative. *Flav Fragr, J.*, **14**, 131-134.

188. Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., Napolitano, A. (2020) Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in nutrition*, 7, 60.

189. Pan, X., Niu, G., Liu, H. (2003) Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process*, **42**, 129-33.

190. Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P. (2009) Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, **14**, 2202-2211.

191. Pham-Huy, C., Stathoulopoulou, F., Sandouk, P., Scherrmann, J. M., Palombo, S., Girre, C. (1999) Rapid determination of valaciclovir and acyclovir in human biological fluids by high-performance liquid chromatography using isocratic elution. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*., **732**, 47–53.

192. Picci, V., Scotti, A., Mariani, M. and Colombo, E. (1987) Composition of the volatile oil of *Pistacia lentiscus* L. of Sardinian Origin. *In Flavour Science and Technologie*, Edited by: Martens, M., Dalen, G.-A. and Russwurm, H. 107–110. New York: J.Wiley & Sons.

193. Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 808–11.

194. Pooter, H. L., Schamp, N. M., Aboutabl, E. A., Tohamy, S. F., Doss, S.L. (1991) Essential oils from the leaves of three Pistacia species grown in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*, **6**, 229–232.

195. Poštić, S. (2009) A kao aromaterapija, Etera, Zagreb

196. Powell, S. (2018) Plants and Distillation – Forever Entwined, Nascent Naturals Inc.

197. Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., & Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10** (2), 155-159.

198. Prasad, T. K., Anderson, M. D. and Stewart, C. R. (1994): Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* **105**, 619–627.

199. Prior, R.L., Lazarus, S.A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J.F. (2001) Identification of procyanidins and antocyanins in blueberries and cranberries (Vaccinium spp.) using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1270-1276.

200. Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.*, **21** (4), 738-745.

201. Rapić, V. (2008) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, 2. izdanje, Školska knjiga, Zagreb.

202. Rasoli, I. (2011) Phytochemicals – Bioactives and Bioavailability and Impact of Health; Chapter 5, Yan Li, Paxton JW (ed) Oral Bioavaliability and Disposition od Phytochemicals. Intech. Shanghai.

203. Rauha, J.P. (2001) The search for biological activity in Finnish plant extracts contaning phenolic compounds, Doctoral dissertation, University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Pharmacy, Helsinski.

204. Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015) Antioxidant, cytoprotective, antiinflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, **7** (3), 274-286.

205. Rice, E.L. (1995) Biological control of weeds and plant diseases, Advances in Applied Allelopathy, *University of Oklahoma Press*

206. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic Compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**, 401-436.

207. Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, **18**, 93-101.

208. Rodriguez-Mateos, A., Heiss, C., Borges, G., & Crozier, A. (2014) Berry (Poly)phenols and cardiovascular health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62** (18), 3842-3851.

209. Rodriguez-Perez, C., Quirantes-Pine, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2013) A metabolite-profiling approach allows the

identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *J Pharmaceut Biomed*., **77**, 167-74.

210. Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002) Identification and Quantification of Galloyl Derivatives, Flavonoid Glycosides and Anthocyanins in Leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal.*, **13**, 79–86.
211. Rosello-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnĉić, M., V. Orlien, Trujillo F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015) Clean Recovery of Antioxidant Compounds from Plant Foods, By-Products and Algae Assisted by Ultrasounds Processing: Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*, **42**, 134-149.
212. Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D. (2009) A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem*. **113**, 336–344.
213. Ruesgas-Ramoµn, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. (2017) Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **6** (18), 3591-3601.
214. Said, S.A., Fernandez, C., Greff, S., Torre, F., Derridj, A., Gauquelin, T., Mevy, J.P. (2011) Inter-population variability of terpenoid composition in leaves of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria: a chemoecological approach. *Molecules*, **16**, 2646–2657.
215. Salami, M., Rahimmalek, M., Ehtemam, M.H. (2017) Comprehensive Research on Essential Oil and Phenolic Variation in Different *Foeniculum vulgare* Populations During Transition from Vegetative to Reproductive Stage. *Chem Biodivers*., **14** (2).
216. Salvador, M.J., De Carvalho, J.E., Wisniewski-Jr, A., Kassuya, C.A.L., Santos, E.P., Riva, D. Stefanello, M.E.A. (2011) Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Casearia lasiophylla* Rev. bras. *Farmacogn*., **21**, 864-868.
217. Sarker, B.C., Hara, M., Uemura, M. (2005) Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Sci. Hort*., **103**, 387–402.
218. Sarmoum, R., Soumia, H., Mohamed, B., Zahreddine, D., Bachar, Z., Othmane, M. (2019) Effect of salinity and water stress on the essential oil components of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomy*, **9** (5), 214.

219. Satya, P., Woods, K.E., Dosoky, N.S., Neupane, S., Setzer, W.N. (2012) Biological activities and volatile constituents of *Aegle marmelos* (L.) Corrêa from Nepal. *J. Medicinally Active Plants*, **1**, 114-122.

220. Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cafalu,W. T., & Raskin, I. (2008) A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism, Clinical and Experimental*, **57**, S3–S.

221. Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., Ahmadi, S. (2007) The effect of distillation methodsand stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chem.*, **100**, 1054–1058.

222. Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Pinol, C., Motilva, M.J. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **879** (19), 1519-1528.

223. Serralutzu, F., Stangoni, A., Amadou, B., Tijan, D., Re, G. A., Marceddu, S., Dore, S., Bullitta, S. (2020) Essential oil composition and yield of a *Rosmarinus officinalis* L. natural population with an extended flowering season in a coastal Mediterranean environment and perspectives for exploitations. *Genetic Resources and Crop Evolution.* doi:10.1007/s10722-020-00939-y

*224.* Sgarbossa, J., Schmidt, D., Schwerz, F., Schwerz, L., Prochnow, D., Caron, B. O. (2019) Effect of season and irrigation on the chemical composition of *Aloysia triphylla* essential oil. *Revista Ceres*, **66** (2), 85–93.

225. Shahidi, F. (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, **44**, 158–163.

226. Shahidi, F., Naczk, M. (2004) Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC Press, Boca Raton, FL*., 352-355.

227. Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J., Corke, H. (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**, 112–119.

228. Silva, J., Abebe W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L. and Matos, F.J.A. (2003). Analgesic and antiinflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *J. Ethnopharmacol*., **89** (2-3), 277‑283.

229. Simon, J.E., Bubenheim, D.R., Joly, R.J., Charles, D.J. (1992) Water stress induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. *J. Essential. Oil. Res*., **4**, 71–75.

230. Sola-Campoy, P. J., Robles, F., Schwarzacher, T., Rejon, C. R., de la Herran, R., Navajas-Perez, R. (2015) The Molecular Cytogenetic Characterization of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Suggests the Arrest of Recombination in the Largest Heteropycnotic Pair HC1. *Plos One*, **10** (12).

231. Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011) Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant properties. *Innov Food Sci Emerg*., **12**, 282–7.

232. Souto-Bachiller, F. A., De-Jesus-Echevarria, M., Cardenas-Gonzalez, O. E., Acuna-Rodriguez, M. F., Melendez, P. A., Romero-Ramsey, L. (1997) Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*, **44**, 1077-1086.

233. Spigno, G., Faveri, D. M. D. (2009) Microwave- assisted extraction of tea phenols, a phenomenological study. *J. Food Eng*., **93**, 210– 217.

234. Spigno, G., Tramelli, L., Marco De Faveri, D. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, **81**, 200–208.

235. Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D., Mason, P.K. (1996) Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, **22** (10), 1887-1899.

236. Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., Soković, M. (2013) Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, **65**, 639-643.

237. Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol*., **203**, 32–43.

238. Šušković, J., Kos, B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov, Andreja; Brozović, Anamaria; Bruvo Mađarić, Branka; Ćetković, Helena; Hranilović, Dubravka; Herak Bosnar, Maja; Katušić Hećimović, Silva; Meštrović Radan, Nevenka; Mihaljević, Snježana; Slade, Neda; Vujaklija, Dušica (ured.), Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb, 949 - 963.

239. Šušković, J., Kos, B. (2017) Tehnologija antibiotika (interna skripta, predavanja), Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

240. Talati, A. (2017) Extraction methods of natural essential oils. doi: 10.13140/RG.2.2.18744.34564.

241. Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7** (3), 1089-1099.

242. Tassou, C.C., Nychas, G.J.E. (1995) Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum *(Pistacia Zentiscus* var. *chia)* on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model Food System. *International Biodeterioration & Biodegradation,* 411-420.

243. Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Kolhir, V.K, Baginskaya, A.I., Tjukavkina, N.A., Kolesnik, Y.A., Selivanova, I.A., Eichholz, A.A. (2000) Dihydroquercetin as a Means of Antioxidative Defence in Rats with Tetrachloromethane Hepatitis. *Phytother Res*., **14** (3), 160–162.

244. Tolić, I. (2003) Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda Pistacia. *Šumarski list*, 9-10, 501-507.

245. Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N. (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric*, **80**, 1024-1032.

246. Toussaint, J.P. (2007) Investigating physiological changes in the aeria parts of AM plants: what do we know and where should we be heading? *Mycorrhiza*. **17**, 349–353.

247. Trabelsi, H., Lajnef, H.B., Arfa, K.B., Boukhchina, S. (2016) Phenolic Compounds Characterization from *Pistacia lentiscus* (lentisc) Fruit. *J. Chem Pharm Res*., **8** (8), 1-8.

248. Trabelsi, H., Renaud, J., Mayer, P., & Boukhchina, S. (2014) Triacylglycerol and Glycerophospholipid Identification and Accumulation During Ripening of *Pistacia lentiscus* L. (Lentisc) Fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **91** (7), 1189–1196.

249. Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukhchina, S., Mayer, P. (2012) Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*, **131** (2), 434–440.

250. Truong, D.H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., Nguyen, H. C. (2019) Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents,

Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 1-9.

251. Valladares, F., Dobarro, I., Sánchez-Gómez, D., Pearcy R.W. (2004) Photoinhibition and drought in Mediterranean woody saplings: scaling effects and interactions in sun and shade phenotypes. *Journal of Experimental Botany*, **56** (411), 483-494.
252. Vaya, J. and Mahmood, S. (2006) Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors*, **28**, 169–175.
253. Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Chemat, F., Cravoto, G., ured. Food engineering series. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. New York, NY, USA: *Springer Science + Business Media*, **4**, 15–52.
254. Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R., Gil-Pelegrin, E. (2003) Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2015–2024.
255. Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH radical. *Talanta*, **71**, 230-235.
256. Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E. (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Inv. Cienc*., **341**, 68–75.
257. Vora, D.J.D. (2017) Insight into the biochemical link between biodiversity and nutraceuticals. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. **11**, 22–25.
258. Vučinić, M., Nedeljković-Trailović, J., Trailović, S., Ivanović, S., Milovanović, M., Krnjaić, D. (2012) Mogućnost primene etarskih ulja u veterinarskoj medicini i stočarstvu s posebnim osvrtom na etarsko ulje origana. *Veterinarski Glasnik*, **66**, 407-416.
259. Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*., **17** (6), 300-312.
260. Wang, Z-h., Hsu, C-c., Yin, M-c. (2009) Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. *Food Chemistry*, **112**, 914-918.

261. Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*, **126,** 485-493.

262. Wojtunik-Kulesza, K., Kasprzak, K., Oniszczuk, T., Oniszczuk, A. (2019) *Natural monoterpenes: much more than only a scent. Chemistry & Biodiversity.* doi:10.1002/cbdv.201900434

263. Wollenweber E. (1994) Flavones and flavonols, U: The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, Harborne, J.B. (Ed.), Chapman & Hall, Cambridge, UK, 259–335.

264. Wulff, A., Anttonen, S., Pellinen, R., Savonen, E.M., Sutinen, M.L., Heller, W., *et al*. (1999) Birch (*Betula pendula* Roth.) responses to high UV-B radiation. *Boreal Environment Research*., **4** (1), 77-88.

265. Wyrepkowski, C.C., Maldonado Gomes da Costa, D.L., Sinhorin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., Campaner dos Santos, L. (2014) Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules*, **19**, 16039-16057.

266. Yosr, Z., Imen, B.H.Y., Rym, J., Chokri, M., Mohamed, B. (2018) Sex-related differences in essential oil composition, phenol contents and antioxidant activity of aerial parts in *Pistacia lentiscus* L. during seasons. *Industrial Crops & Products*, **121**, 151-159.

267. Young J.E., Zhao X., Carey E.E., Welti R., Yang S.S., Wang W. (2005) Phy-tochemical phenolic in organically grown vegetables. *Mol. Nut. Food Res*., **49**, 1136-1142.

268. Zeng, Y., Guo, L., Chen, B., Hao, Z., Wang, J., Huang, L., Yang, G., Cui, X., Yang, L., Wu, Z., Chen, M.L., Zhang, Y. (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: Current research status and prospectives. *Mycorrhiza*, **23**, 253–266.

269. Zitouni, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Ghembaza, N., Toul, F., Atik Bekkara, F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **8** (4), 627-633.

270. Zohary, D. (1952) A monographical study of the genus Pistacia Palestine. *J Bot (Jerusalem Series)*, **5**, 187-228.

271. Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B. (2003) Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco - a seasonal variation. *Flavour Fragr. J.*, **18**, 475–480.

# ŽIVOTOPIS

**Sanja Dragović** rođena je 5. srpnja 1984. u Zagrebu. Osnovnu školu, "Josip Račić" i srednju 7. Gimanziju općeg smjera završila je u Zagrebu. Godine 2003. upisala je Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo gdje je i diplomirala 2009. godine. Diplomski rad pod naslovom ″Antifungalni učinak bakterija mliječne kiseline na rast odabranih sojeva plijesni" izradila je pod vodstvom prof. dr. sc. Frane Delaša, te obranila u rujnu 2009. godine.

U studenome 2013. godine zaposlila se kao Prodajni predstavnik medicinskog metrijala tvrtke Sanol H d.o.o. iz Zagreba, gdje je radila do srpnja 2014. godine. Od 2014. godine zaposlena je u Laboratoriju za plinsku kromatografiju Ireks Arome d.o.o. kao samostalni inženjer Razvoja. Akademske godine 2009./2010. upisala je poslijediplomski (doktorski studij) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, znanstveno područje Biotehničke znanosti.

Do sada je objavila tri znanstvena rada iz polja prehrambene tehnologije i biotehnologije, te je sudjelovala na 2 međunarodna kongresa.