

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nejla Susak

6926/PT

**UTJECAJ LOKACIJE UZGOJA I TERMINA BERBE NA
FENOLNE SPOJEVE LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ LOKACIJE UZGOJA I TERMINA BERBE NA FENOLNE SPOJEVE LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)

Nejla Susak, 0058205245

Sažetak: Tršlja je vazdazelena biljka, karakteristična za mediteransko područje, a smatra se bogatim izvorom fenolnih spojeva. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj lokacije uzgoja i termina berbe na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva lista tršlje. Uzorci su brani sa 4 lokacije s područja Hrvatske u 2 termina berbe. Za provođenje ekstrakcije korištena je vodena otopina etanola, a maseni udjeli ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određeni su spektrofotometrijskim metodama. Prema dobivenim rezultatima, najviše koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola zabilježene su na Korčuli u prvom terminu berbe (8,71 mg/g uzorka, 9,85 mg/g uzorka i 9,13 mg/g uzorka). U drugom terminu berbe, na Korčuli je određena najniža koncentracija ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola (3,96 mg/g uzorka, 5,05 mg/g uzorka, 4,58 mg/g uzorka), dok je najviša koncentracija ukupnih flavonoida zabilježena na Hvaru (8,62 mg/g uzorka). Najviše koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola u drugom terminu berbe određene su na Barbarigi (7,73 mg/g uzorka, 8,27 mg/g uzorka).

Ključne riječi: *Pistacia Lentiscus* L., flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli

Rad sadrži: 29 stranica, 16 slika, 1 tablica, 44 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Datum obrane: rujan 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF GROWTH LOCATION AND HARVEST TIME ON PHENOLIC COMPOUNDS IN MASTIC TREE LEAVES (*Pistacia lentiscus* L.)

Nejla Susak, 0058205245

Abstract: Mastic tree is an evergreen plant, characteristic in the Mediterranean area and is considered as a rich source of phenolic compounds. The aim of this study was to determine the influence of the growth location and harvest time on the concentration of the total phenolic compounds in mastic tree leaves. Samples are collected from 4 locations in Croatia in 2 harvest periods. Aqueous ethanol solution was used for extraction, while mass concentrations of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols were determined by spectrophotometric methods. According to the results, in the first harvest period, the highest concentration of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols were found on Korčula (8,71 mg/g sample, 9,85 mg/g sample and 9,13 mg/g sample). In the second harvest period, the lowest concentrations of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols (3,96 mg/g sample, 5,05 mg/g sample, 4,58 mg/g sample) were determined at Korčula, while the highest concentration of total flavonoids was found on Hvar (8,62 mg/g sample). The highest concentrations of total hydroxycinnamic acids and flavonols in the second harvest period were determined at Barbariga (7,73 mg/g sample, 8,27 mg/g sample).

Keywords: *Pistacia lentiscus* L., flavonoids, hydroxycinnamic acids, flavonols

Thesis contains: 29 pages, 16 figures, 1 table, 44 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Ivona Elez Garofulić

Defence date: September 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Tršlja (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	2
2.2.1. Kemijski sastav tršlje.....	3
2.1.2. Utjecaj na zdravlje	4
2.2. Fenolni spojevi tršlje.....	5
2.2.1. Flavonoidi	5
2.2.2. Fenolne kiseline	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Osušeni listovi tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	12
3.1.2. Kemikalije i standardi	12
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Ekstrakcija.....	15
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida	15
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida	20
4.2. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina	21
4.3. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonola.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA.....	25

1. UVOD

Tršlja, *Pistacia Lentiscus* L., poznata kao drvo mastike, je vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). Obuhvaća oko 12 vrsta od kojih su najpopularnije *P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, i *P. lentiscus*. U Hrvatskoj je, uz tršlju, zastupljena i smrdljika (*P. terebinthus*). Rasprostranjena je na području Mediterana, Maroka, Iberijskog poluotoka, Francuske, Turske, Iraka, Irana, a u Hrvatskoj raste na otocima i priobalju (Istra, Kvarner, Dalmacija). Prilagodila se mediteranskoj klimi, dobro podnosi sušu, visoke temperature i visoke koncentracije soli.

Bogat je izvor smole, esencijalnih ulja, galne kiseline, antocijanina, flavonol glikozida, terpenoida, α -tokoferola i arabinogalaktana. Stablo tršlje poznato je od antičkog doba te se u narodnoj medicini koristila u liječenju različitih oboljenja. Njeno pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje može se pripisati polifenolnim spojevima. Fenolni spojevi čine skupinu od jednostavnijih spojeva, fenola i fenolnih kiselina do kompleksnijih spojeva iz skupine flavonoida (flavanoli, flavonoli, flavoni, antocijanini), kondenziranih i hidroliziranih tanina. Fenoli doprinose zaštiti od degenerativnih bolesti te se ističu antioksidacijskim, antibakterijskim, protuupalnim, antialergijskim, antimutanogenim, antiviralnim te antikancerogenim djelovanjem. Specifični su za pojedinu biljnu vrstu pa njihov sastav i udio ovisi o faktorima klime, sastavu tla, sorti, vanjskim utjecajima. Izoliraju se iz različitih dijelova biljke tršlje, a posebice plodova i lišća.

Cilj ovog istraživanja bilo je usporediti lokaciju i termine berbe lista tršlje te njihov utjecaj na masene koncentracije fenolnih spojeva ekstrahiranih iz lista tršlje. Koristilo se 8 uzoraka sa 4 različite lokacije (Lun, Hvar, Korčula i Barbariga) ubranih u 2 termina berbe (s međusobnim razmakom od 3 mjeseca). Određivani su slijedeći fenolni spojevi: ukupni flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.)

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). Latinsko ime roda *Pistacia* potječe od grčke riječi „*pissa*“ (smola) i „*akeomai*“ (izliječiti), zbog ljekovite smole. (Gligić, 1953).

Dvodomna je, entomofilna, kserofitna i jedina zimzelena biljna vrsta roda pistacija, koja raste u obliku grma ili niskog drveća u zemljama mediteranskog područja. Kora je u mladosti zelenkastosiva i glatka, kasnije postane tamnozeleno i ispucana na sitne ljuske. Lišće je zimzeleno, parno, perastog oblika. Ima 3-5 pari jajoliko-lancetastih kožastih listića tamnozeleno boje. Cvijeta od ožujka do svibnja. Cvjetovi su jednospolni, tamnocrvene boje u obliku klasića, imaju jednostavno ocvijeće sastavljeno od 3-5 listića. Plodovi su sitni (2-3 mm), spljoštene okrugle koštunice, gusto naslagane na granama. U početku su crvene boje, a dozrijevaju u kasnu jesen i tada pocrne. Iz ozlijeđene kore curi mirišljav smolasti sok (mastika) (Tolić, 2003.)

Raste na području Sredozemnog mora, prekriva prostor sjeverne Afrike, južne Europe i zapadne Azije. Raste na uzvisinama, između razine mora i 2 000 metara nadmorske visine (Rhodes i Maxted, 2016).



Slika 1. Cvjetovi tršlje (Anon., 1)



Slika 2. Listovi i plodovi tršlje (Anon., 1)

2.2.1. Kemijski sastav tršlje

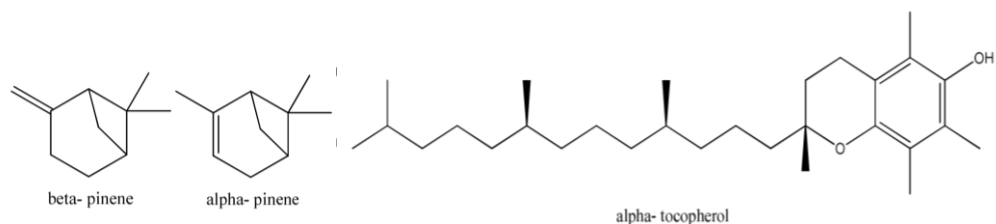
Eterično ulje je jedna od glavnih komponenti izoliranih iz različitih dijelova tršlje, uključujući lišće, smolu, grančice i cvjetove. Analiza eteričnih ulja uglavnom se provodi pomoću tehnika temeljene na plinskoj kromatografiji (GC) (Bozorgi i sur., 2013). Monoterpeni su glavni kemijski sastojci u eteričnim uljima, a najznačajniji od njih smatra se α -pinen. (Koutsoudaki i sur., 2005).

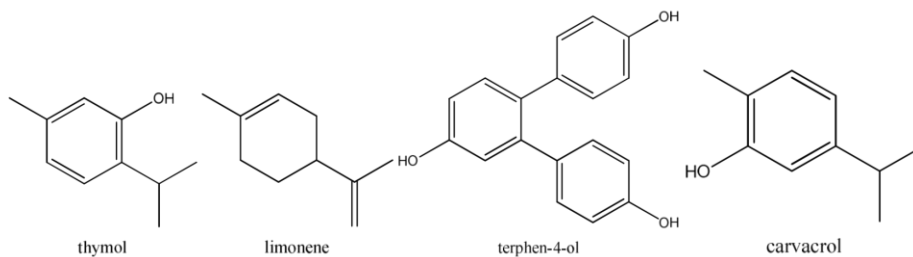
Eterično ulje lišća sadrže β -kariofilen (31,38%), germaeren (12,05%) i γ -kadinen (6,48%) (Douissa i sur., 2005). Kao glavne komponente u listovima tršlje nađeni su limonen, mircen, sabinen i terpinen-4-ol, β -mircen i sabinen u plodovima, terpinen-4-ol u nadzemnim dijelovima (Bozorgi i sur., 2013).

U drugom istraživanju utvrđeno je da ulje mastike sadrži 90 % monoterpena, od kojih je 79 % α -pinena i 3% β -mircena, ulje lišća sadrži 50 % monoterpena od čega 11 % α -pinena i 19 % β -mircena te također sadrži 25 % seskviterpena. Nezreli plod sadrži 22 % α -pinena, 54 % β -mircena, dok zreo plod sadrži 11 % α -pinena i 72 % β -mircena (Wyllie i sur., 1990).

U smoli tršlje nađeni su α -pinen, β -pinen, limonen, terpen-4-ol i terpineol (Congiu i sur., 2002) te polimer monoterpena 1,4-pol- β -mircen koji je prvi poznati primjer polimera terpena (Berg i sur., 1998). Chios mastika sadrži arabinogalaktične proteine (AGPs) za koje se smatra da smanjuju infekciju uzrokovanu bakterijom *Helikobakter pylori* (Kottakis i sur., 2009)

Sadržaj masti u zreom plodu iznosi 32,8-45%. Tijekom zrenja plodova zabilježeno je povećanje oleinske masne kiseline, a smanjenje linolenske masne kiseline (Trabelsi i sur., 2012). Ostale zastupljene masne kiseline su palmitinska, palmitolska, stearinska, miristinska, arahidonska masna kiselina. Najznačajniji zabilježeni sterol je β -sitosterol uz kampesterol, Δ^5 -avenasterol, stigmasterol, brasikasterol. Također, ulje ploda, osim njegovog poželjnog mirisa i okusa, preporučeno je kao novi izvor za proizvodnju biljnih ulja u vezi s velikom količinom mono-nezasićenih i omega-3 masnih kiselina poput oleinske kiseline, linolenske kiseline i velike količine fitosterola poput β -sitosterola. (Kizil i Turk, 2010). Prema (Kivčak i Akay, 2005) u listovima je nađena i značajna koncentracija α -tokoferola.





Slika 3. Kemijske strukture važnih komponenata tršlje (Nahida i sur., 2012)

2.1.2. Utjecaj na zdravlje

Veliki broj istraživanja pokazao je antimikrobnu aktivnost tršlje na širokom rasponu mikroorganizama, uključujući gram-pozitivne i gram-negativne (npr. *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas flagii* i *Salmonella enteritidis*), aerobne i aerobne bakterije, viruse i gljivice. Rezultati su pokazali da su α -pinen, verbenon, R-terpineol, linalool, karvakrol i flavoni glavni spojevi povezani s antibakterijskom aktivnošću kod *Escherichie coli*, *Staphylococcus aureus*, i *Bacillus subtilis*. (Bozorgi i sur., 2013).

Mastika tršlje je pokazala selektivno antibakterijsko djelovanje protiv *Porphyromona gingivalis* i *Prevotella melaninogenica*, smanjujući nastajanje plaka na zubima i inhibirajući rast bakterija u slini (Bozorgi i sur., 2013).

Također, ustanovljeno je da smola tršlje inhibira oksidaciju LDL-a u minimalnoj dozi od 2,5 mg (75,5 %) i u maksimalnoj dozi od 50 mg (99,9 %) (Janakat i sur., 2002).

Esencijalna ulja sakupljena u fazi cvjetanja sa visokim sadržajem monoterpena (45-68,35 %) pokazala su visoku antioksidacijsku aktivnost i zaštitu od slobodnih radikala (Assimopoulou i sur., 2005). Prirodna smola i bioaktivni triterpeni iz eteričnih ulja su također pokazali sposobnost antioksidacije te se zbog toga mogu naći u funkcionalnoj hrani. (Bhour i sur., 2009).

Galna kiselina, digalna kiselina i 1,2,3,4,6-pentagalolilglukoza, izolirani polifenoli iz plodova tršlje, pokazali su inhibitornu aktivnost protiv mutanogenosti i genotoksičnosti u *in vitro* testovima (Bhour i sur., 2010).

Efektivna je i u liječenju gastrointestinalnih poremećaja, u dozi od 500 mg/kg pomogla je kod smanjenja oštećenja želučane sluznice. Uočeno je i hepatoprotektivno i antikancerogeno djelovanje te učinkovitost u liječenju i zacjeljivanju rana (Nahida i sur., 2012).

2.2. Fenolni spojevi tršlje

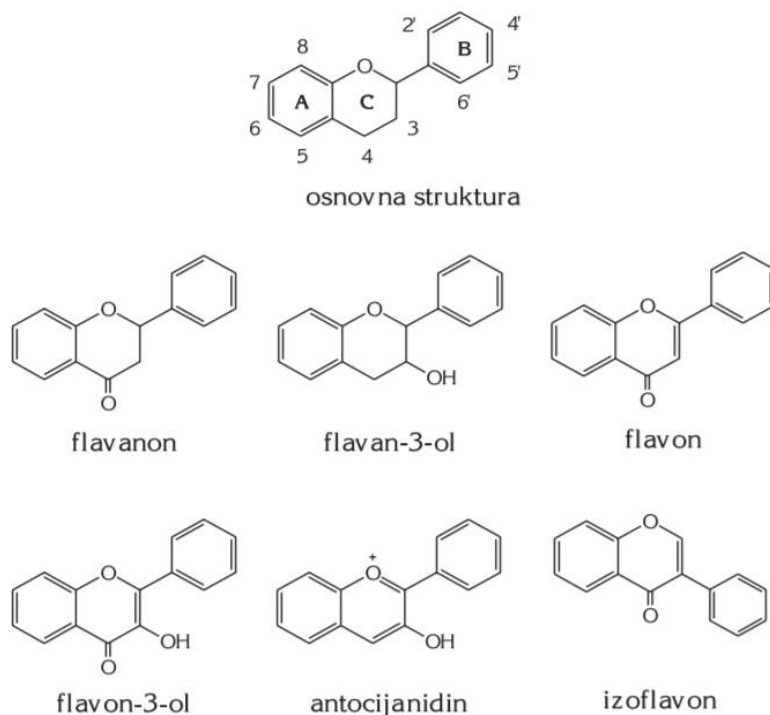
Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama, poznato ih je oko 8000 te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Harborne, 1999). Međusobno se razlikuju po strukturi, njihovu osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Izuzetno su važni tijekom rasta i reprodukcije, osiguravajući zaštitu protiv patogena i predatora (Bravo, 1998). Također, doprinose boji i senzorskim karakteristikama voća, povrća te ostalih sirovina u kojima se nalaze. Fenolni spojevi imaju širok niz pozitivnih efekata na zdravlje tako što djeluju antialergijski, antioksidacijski, antimikrobno, protuupalno i kardioprotektivno (Benavente-Garcia i sur., 2005). Najkorisniji učinak fenolnih spojeva na ljudsko zdravlje pripisuje se visokoj antioksidacijskoj aktivnosti (Heim i sur., 2002). Djeluju kao antioksidansi zahvaljujući sposobnosti prelaska u fenoksil-radikale otpuštajući atom vodika koji se veže na slobodne radikale. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na:

- 1) fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne);
- 2) flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani, itd.);
- 3) tanine (kondenzirani i hidrolizirani);
- 4) ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini) (Naczki i Shahidi, 2006).

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su, kao najrasprostranjenija podskupina fenolnih spojeva, prisutni u svim djelovima zelene biljke: korijenu, lišću, stabljici i plodovima. Dosad je identificirano više od 6400 flavonoida. Osnovnu strukturu čini difenilpropanski kostur C₁₅ (C₆-C₃-C₆), odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik. Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren (Macheix i sur. 1990). Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama (Harborne i Baxter, 1999.). Glikozilacija kod flavonoida uglavnom se događa na položaju 3, a rjeđe na položaju 7. Šećer koji se najčešće veže na aglikonski dio je glukoza, no pojavljuju se i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza te neki disaharidi kao što je

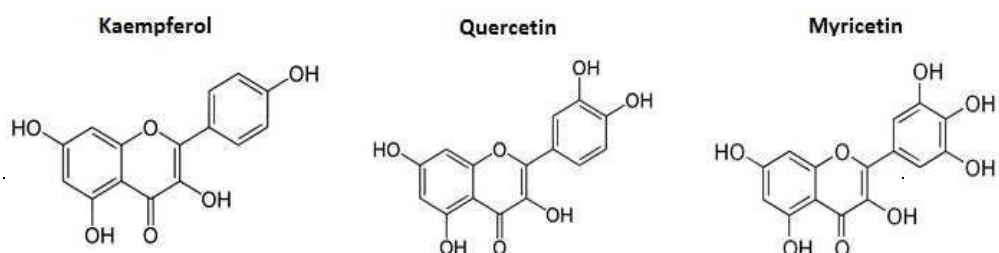
rutinoza (Miller i Ruiz-Larrea, 2002). Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena dijele se na: flavone, flavonole, flavanone, flavan-3-ole (katehini), antocijanidine i izoflavone (Kazazić, 2004).



Slika 4. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

2.2.1.1. Flavonoli

Flavonoli se od drugih flavonoida ističu dvostrukom vezom između C2 i C3 atoma C prstena, a za razliku od flavona imaju hidroksilnu skupinu na C3 atomu C prstena dok flavoni nemaju. Hidroksilna skupina može vezati šećer, tj. može se glikozilirati te su u takvom obliku najčešće i prisutni. Najčešći šećeri su glukoza i ramnoza, ali mogu biti uključeni i drugi, kao što su: galaktoza, ksiloza, amiloza.



Slika 5. Kemijska struktura najčešćih flavonola (Brodowska, 2017)

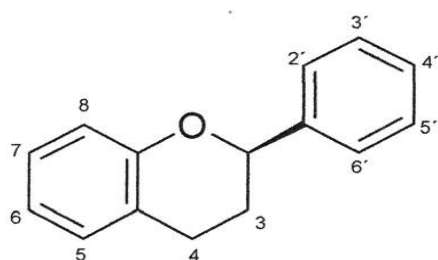
U lišću tršlje, od pristunih flavonola, najviše se ističe miricetin. Naime, od ukupne količine polifenola u lišću tršlje derivati miricetina čine 20 %. Najistaknutiji derivati miricetina: miricetin glukuronid ($3,9 \pm 0,65$ mg/g suhog lišća) miricetin 3-*O*-rutinozid ($4,5 \pm 0,18$ mg/g suhog lišća) i miricetin 3-*O*-ramnozid ($6,8 \pm 1,04$ mg/g suhog lišća). Od derivata kvercetina, uz kvercetin 3-*O*-ramnozid ($3,7 \pm 0,52$ mg/g suhog lišća), u nadzemnim dijelovima biljke detektiran je i kvercetin-3-glukozid (Romani i sur., 2002).

Rodríguez-Perez i sur. (2013) identificirali su i značajnu koncentraciju derivata kamferola, kao što su kamferol arabinozid (115 ± 5 mg/kg biljke) i kamferol-3-glukozid ($37,2 \pm 0,9$ mg/kg biljke).

2.2.1.2. Flavanoli

Flavan-3-oli su najraširenija skupina flavonoida. Imaju zasićenu vezu između C2 i C3 atoma C-prstena. Glavni predstavnici flavanola su:

- (+)-katehin,
- (-)-epikatehin,
- (+)-galokatehin,
- (-)-epigalokatehin.



FLAVAN-3-OLI

<i>katehin</i>	(2R, 3S) 5=7=3'=4'=OH
<i>epikatehin</i>	(2R, 3r) 5=7=3'=4'=OH

Slika 6. Kemijska struktura flavanola (Robards i sur., 1999)

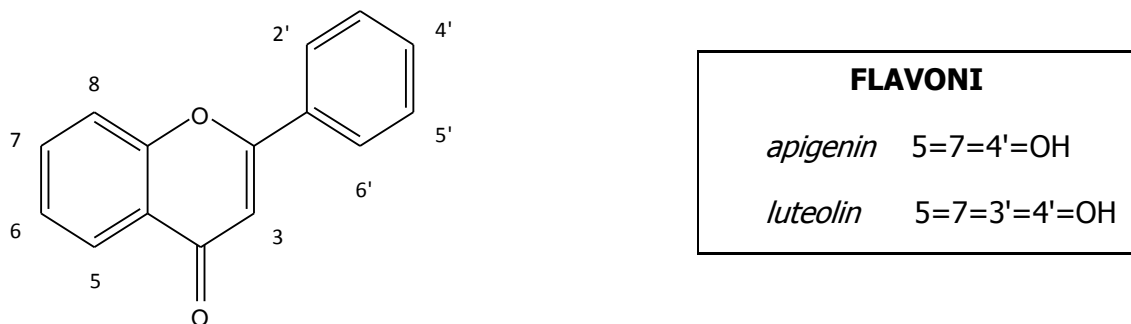
Prema Azaizeh i sur. (2013), u listovima tršlje, od ukupne količine polifenola, uz derivate galne kiseline i flavonol glikozide, katehin čini 7,8 %. Pomoću HPLC-a, detektiran je u koncentraciji od $5,6 \pm 0,3$ mg/L sirovog ekstrakta.

Romani i sur. (2002) odredili su katehin u koncentraciji od $1,8 \pm 0,98$ mg/g osušenog lišća, dok su Rodríguez-Perez i sur. (2013) također odredili značajnu koncentraciju katehina (3350 ± 40 mg/kg biljke), uz prisutni D-galokatehin.

2.2.1.3. Flavoni

Flavoni su po svojoj strukturi slični flavonolima, no za razliku od flavonola nemaju hidroksilnu skupinu na C3-atomu C prstena (Macheix i sur., 1990). Rasprostranjeni su među biljkama u obliku aglikona ili glikozida, a njihova sinteza može se regulirati pomoću UV zračenja (Hostetler i sur, 2017). Najznačajniji predstavnici su luteolin i apigenin.

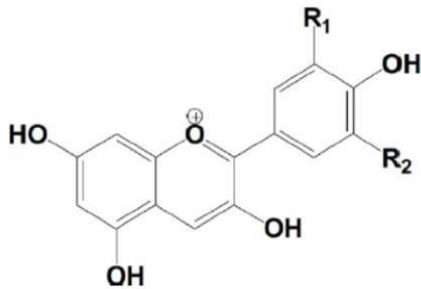
Iz skupine flavona, u lišću tršlje prisutan je luteolin u koncentraciji od 100,95 mg/kg biljke (Rodríguez-Perez i sur., 2013).



Slika 7. Kemijska struktura flavona (Robards i sur., 1999)

2.2.1.4. Antocijani

Antocijani predstavljaju veliku skupinu u vodi topljivih biljnih pigmenta koji su odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju voća i povrća. Prema kemijskoj strukturi su derivati 2-fenilbenzopiriljevih (flavilijevih) soli, a u biljkama se nalaze u obliku glikozida, dok se aglikoni nazivaju antocijanidini.



Slika 8. Kemijska struktura antocijana (Tsao, 2009)

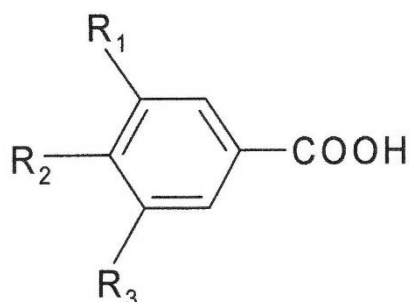
Od antocijana detektiranih u lišću i plodu tršlje, određeni su delfinidin 3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-glukozid u nešto manjim koncentracijama ($0,8 \pm 0,22$ i $0,4 \pm 0,12$ mg/g suhog lišća) (Romani i sur., 2002). Karakteristična boja plodova tršlje pripisuje se njihovoj prisutnosti u plodovima (Longo i sur., 2007).

Antocijani iz tršlje su našli primjenu u prehrambenoj industriji kao prehrambena bojila (Bozorgi i sur., 2013).

2.2.2. Fenolne kiseline

Drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri. Hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline se razlikuju u stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog pretena (Macheix i sur., 1990).

Hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu, *p*-hidroksibenzojevu, vanilinsku i siringinsku kiselinu, kojima je zajednička C6-C1 struktura (Bravo, 1998).



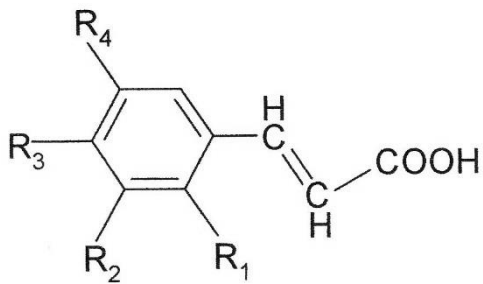
Slika 9. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	
1.galna	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH
2.protokatehinska	R ₁ =H R ₂ =R ₃ =OH
3.vanilinska	R ₁ =H R ₂ =OH R ₃ =OCH ₃
4.siringinska	R ₂ =OH R ₁ =R ₃ =OCH ₃

Lišće tršlje se smatra bogatim izvorom polifenolnih spojeva (7,5 % mase suhog lišća), a velika važnost se pridaje hidroksibenzojevim kiselinama i njenim derivatima. Ističu se galna kiselina (3,7 ± 0,56 mg/g suhog lišća) i derivati galne kiseline kao što su 5-*O*-galoilkina kiselina (9,6 ± 2,25 mg/g suhog lišća), 3,5-*O*-digaloilkina kiselina (26,8 ± 4,67 mg/g suhog lišća), 3,4,5-*O*-trigaloilkina kiselina (10,3 ± 2,45 mg/g suhog lišća) i mono-galoil glukoza (2,8 ± 0,15 mg/g suhog lišća). Derivati galne kiseline zastupljeni su u visokom udjelu, odnosno čine 5,3 % suhe mase lišća (Romani i sur., 2002).

Mnogim istraživanjima utvrđeno je da fenolni spojevi pokazuju pozitivne efekte na zdravlje te su tako Bhour i sur. (2010) pokazali da digalna kiselina iz plodova tršlje posjeduje antimutanogena svojstva dok su Abdelwahed i sur. (2007) predstavili 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza i galnu kiselinu iz plodova kao antioksidacijske i antimutanogene spojeve.

Hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi s C6-C3 strukturom, a dijele se na *p*-kumarinsku kiselinu, kafeinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu, sinapinsku kiselinu (Bravo, 1998).



Slika 10. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)

HIDROKSICIMETNE KISELINE

1.ferulinska	R ₁ =R ₂ = R ₄ =H R ₃ =OH R ₄ =OCH ₃
2.p- kumarinska	R ₁ =R ₂ =H R ₃ =OH
3.kava	R ₁ =R ₂ =H R ₃ = R ₄ =OH
4.sinapinska	R ₁ =H R ₃ =OH R ₄ = R ₂ =OCH ₃

Dok su hidroksibenzojeve kiseline identificirane kao jedna od glavnih skupina sekundarnih biljnih metabolita u lišću tršlje, hidroksicimetne kiseline su zastupljene u manjoj koncentraciji, u obliku *p*-kumarinske kiseline (Benhammou i sur., 2008).

Osim u lišću, drugim istraživanjem utvrđena je prisutnost *p*-kumarinske kiseline u drugim dijelovima biljke kao što su plodovi i stabiljka. (Yemmen i sur., 2017).

U smoli tršlje, uočene su značajne koncentracije *p*-kumarinske kiseline, *o*-kumarinske kiseline, ferulinske kiseline, kafeinske kiseline i sinapinske kiseline (Trabelsi i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Osušeni listovi tršlje (*Pistacia lentiscus L.*)

U ovom istraživanju korišteni su listovi tršlje (*Pistacia lentiscus L.*) ubrani 2017. godine u dva termina berbe (s razmakom od 3 mjeseca od prve do druge berbe) na četiri lokacije na području Hrvatske: Lun, Korčula, Barbariga, Hvar.

Nakon branja, uzorci su prenošeni u vinskim vrećama i isti dan kada su se brali stavljani u prostoriju sobne temperature te ostavljeni 5 dana da se posuše. Uzorci za analize su nakon 5 dana samljeveni i stavljani u plastične spremnike u frižider na temperaturu 4-5 °C.

Tablica 1. Termini berbe i koordinate lokacija ubranih uzoraka lista tršlje (*P. lentiscus L.*)

Lokacija	1. berba	2. berba	Koordinate
Lun	05.05.2017.	02.08.2017.	44,683128/14,754214
Korčula	04.05.2017.	01.08.2017.	42,961182/16,721574
Barbariga	05.05.2017.	02.08.2017.	44,991008/13,736675
Hvar	05.05.2017.	02.08.2017.	43,130962/16,942946

3.1.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupak ekstrakcije

Otapala za ekstrakciju:

- Destilirana voda
- 70 %-tna vodena otopina etanola

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

- Etanol, 96 %-tni (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

- Metanol, 100 %-tni (J.T. Baker, Nizozemska)
- Aluminijev klorid, 10 %-tni (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Kalijev acetat, 1 M
Priprema: 9,845 g kalijeva acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Standard kvercetin (100 mg/L)
Priprema: Odvaži se 10 mg standarda kvercetin u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 % (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija)
- Etanol, 96 % (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu)
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L) (Sigma-Aldrich, Steinham, Njemačka)
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standardne kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80 %-tnim metanolom.
- Standard kvercetin (100 mg/L)
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetin u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda kvercetin u plastičnoj lađici za vaganje te se

pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar (UV-1600PC, VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD)
- Analitička vaga (Ohaus, AX224, SAD)
- Vortex
- Ultrazvučna kupelj (Sonorex Super RK 100/H, Bandelin, Njemačka)

Pribor:

- Staklene kivete
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 μ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 50 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Stalac za epruvete
- Erlenmayerova tikvica
- Lijevak

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija

Samljeveni uzorci prije analize čuvani su u hladnjaku na temperaturi 4-5 °C. Za provođenje ekstrakcije odvagano je 1 g svakog uzorka u Erlenmayerovu tikvicu sa brušenim grlom. Uzorcima se doda 40 mL otapala za ekstrakciju (70 %-tna vodena otopina etanola). Uzorci su ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji na temperaturi od 50 °C kroz 20 minuta. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira kroz filter papir u odmjerne tikvice od 50 mL te nadopuni do oznake sa otapalom za ekstrakciju.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

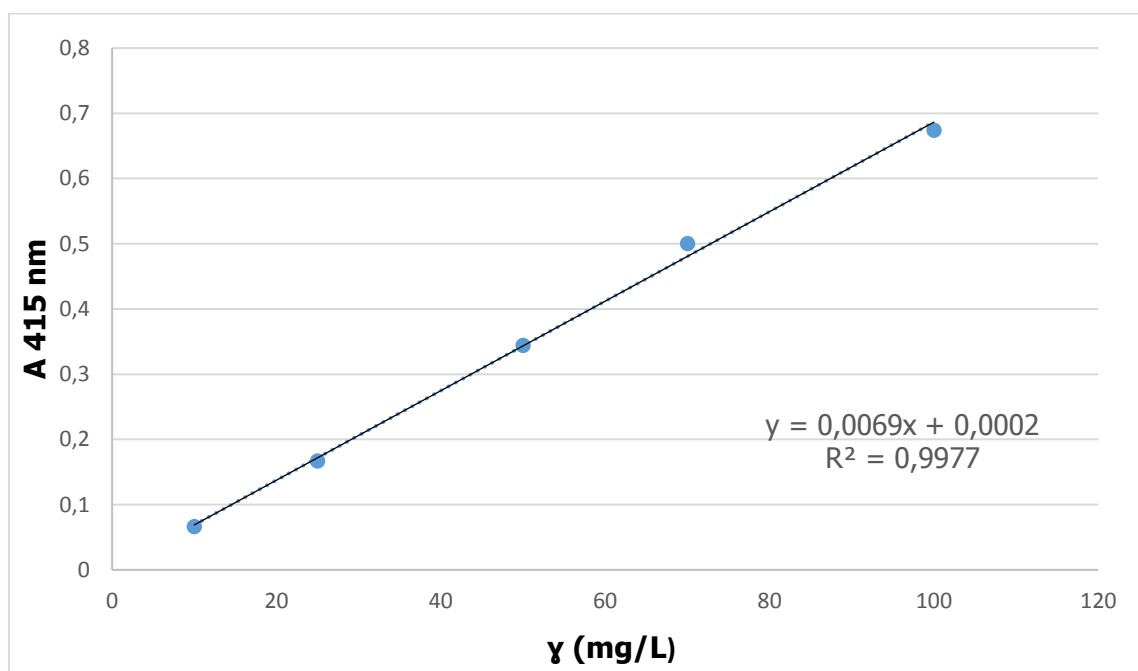
Izračunavanje

Izrada baždarnog dijagrama

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u

tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta dodaje 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. (Slika 11.)



Slika 11. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kvercetina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0069x + 0,0002$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 415 nm

x-koncentracija kvercetina (mg/L)

R²- faktor determinacije

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje se provodi u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

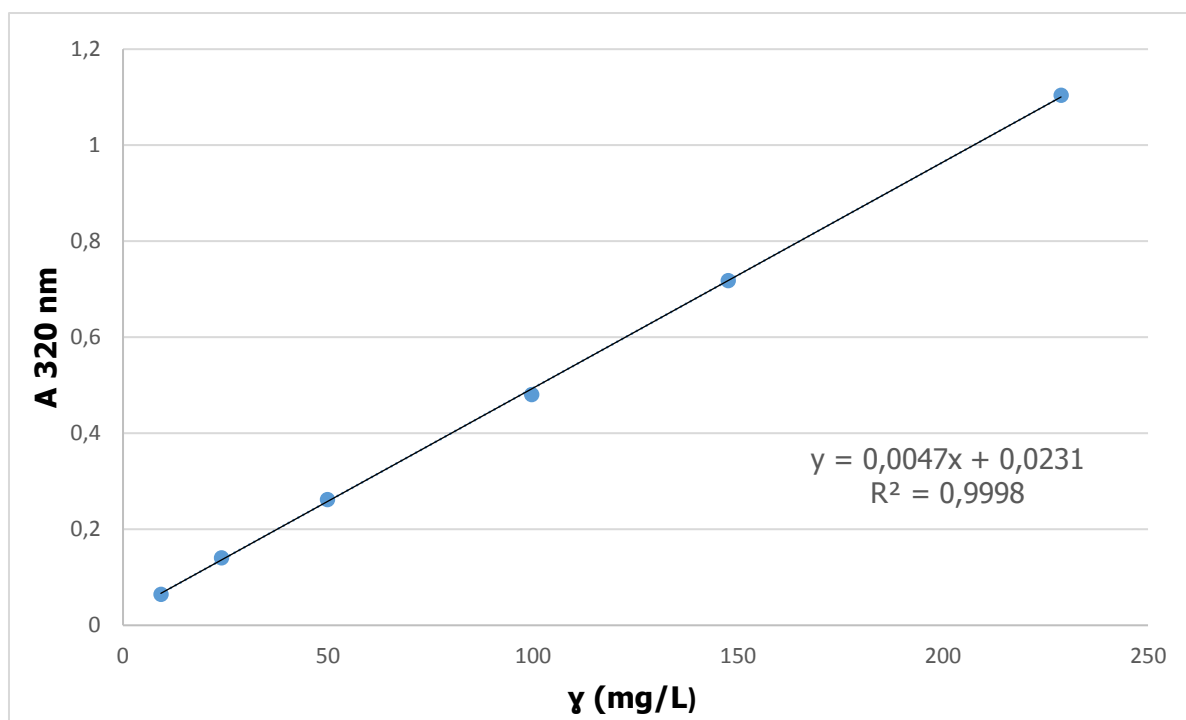
Izračunavanje

Izrada baždarnog dijagrama

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

a) Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg/L potrebno je pripremiti razrjeđenja: 9.23, 23.99, 49.82, 99.63, 147.60, 228.78 mg/L. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL 1g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. (Slika 12.)



Slika 12. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kafeinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0047x + 0,0231$$

gdje je:

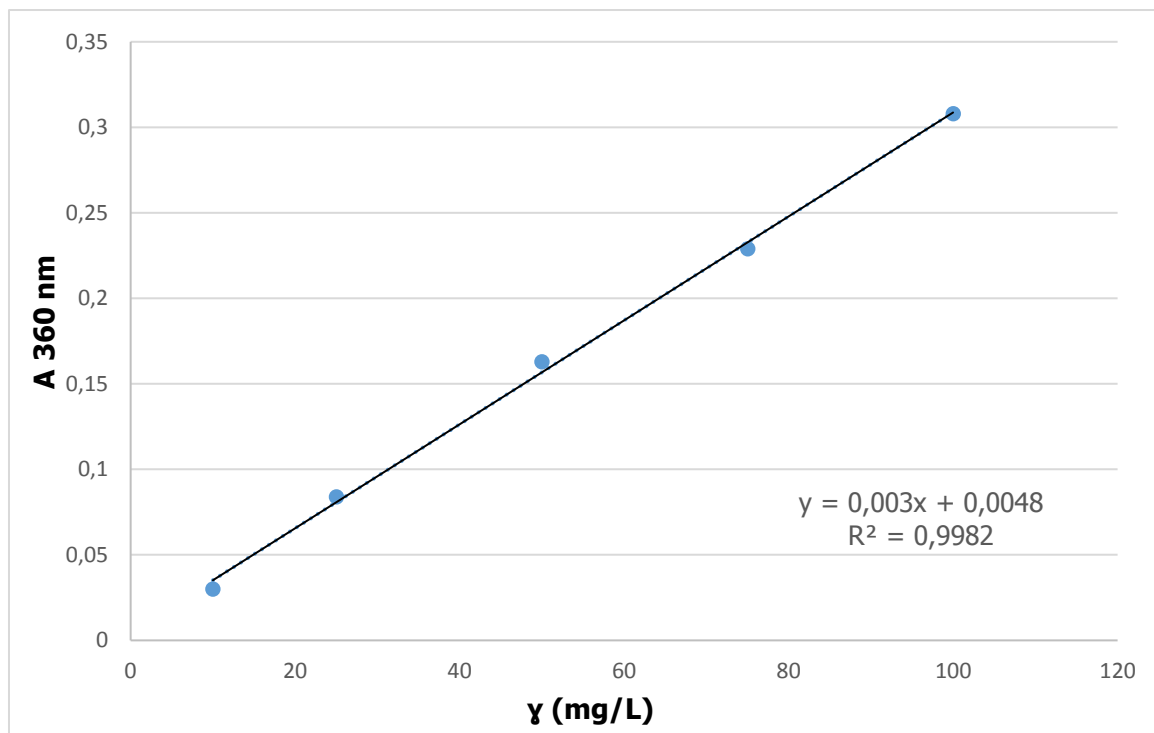
y- apsorbancija uzorka pri 320 nm

x-koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

R²- faktor determinacije

b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razređenja: 2.5, 5, 10, 25 i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 mL i nadopuni 100 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm. (Slika 13.)



Slika 13. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji kvercetina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,003x + 0,0048$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 360 nm

x-koncentracija kvercetina (mg/L)

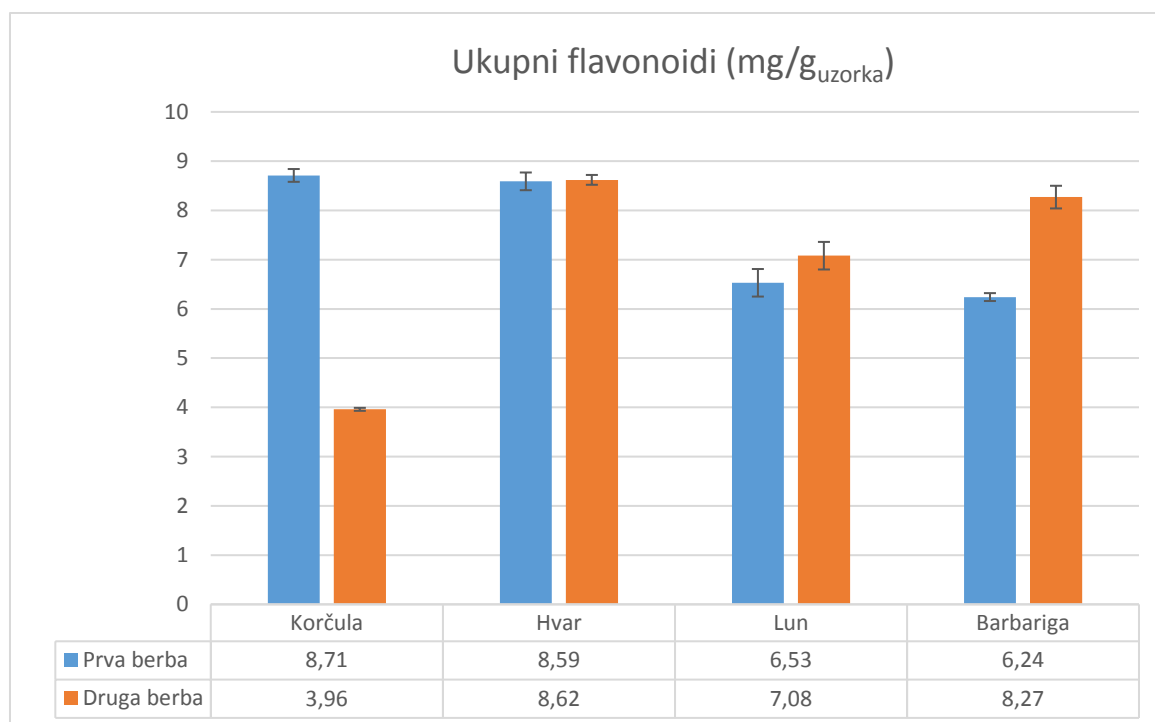
R²- faktor determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista tršlje sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola. Uzorci lista tršlje ubrani su na četiri lokacije u dva termina berbe. Količina ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određena je spektrofotometrijski.

4.1. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida

Rezultati utjecaja lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida prikazani su grafički na slici 14, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.



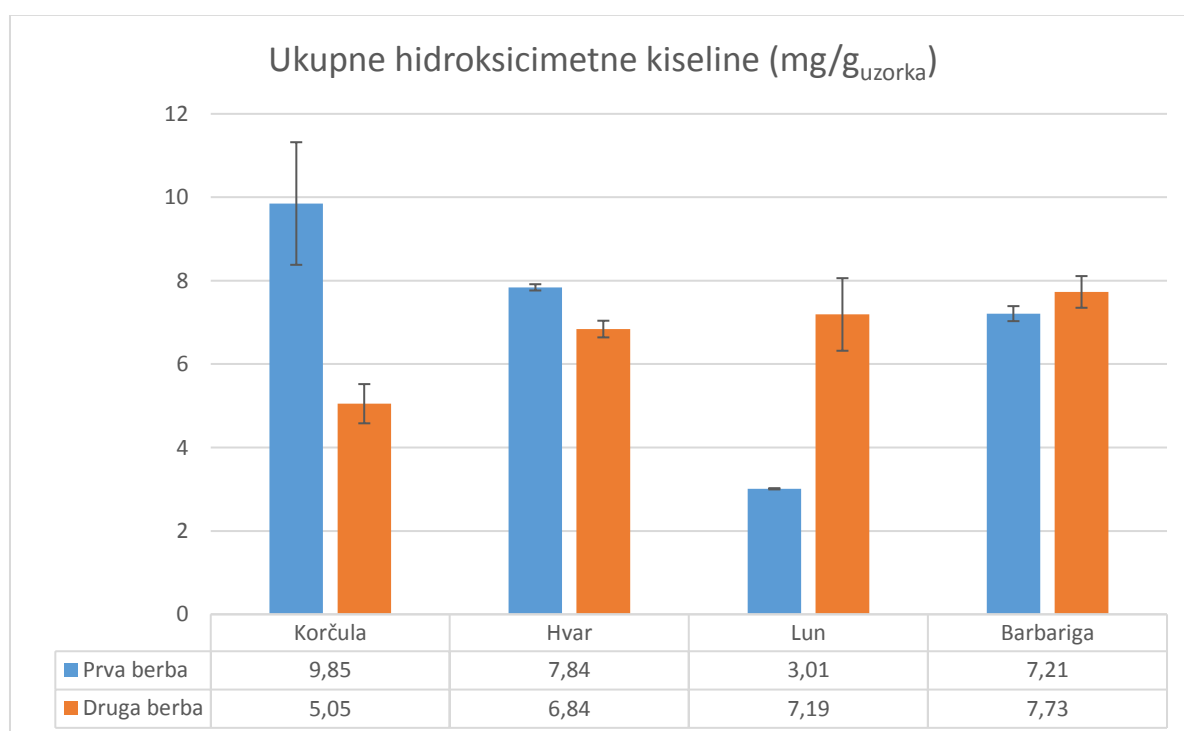
Slika 14. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida

Maseni udjeli ukupnih flavonoida u prvom terminu berbe kreću se od 6,24 mg/g uzorka do 8,71 mg/g uzorka, a u drugom terminu od 3,96 mg/g uzorka do 8,27 mg/g uzorka. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je s obzirom na lokaciju u prvom terminu berbe najveći udio ukupnih flavonoida zabilježen na Korčuli te iznosi 8,71 mg/g uzorka, potom na Hvaru (8,59 mg/g uzorka), Lunu (6,53 mg/g uzorka) te Barbarigi (6,24 mg/g uzorka). Vidljivo je da je s obzirom na lokaciju u drugom terminu berbe, a u odnosu na prvi termin

berbe, na Korčuli maseni udio ukupnih flavonoida manji te iznosi 3,96 mg/g uzorka. Na lokacijama Hvar, Lun i Barbariga, rezultati pokazuju suprotno, odnosno maseni udjeli ukupnih flavonoida veći su u drugom terminu berbe i iznose 8,62 mg/g uzorka, 7,08 mg/g uzorka i 8,27 mg/g uzorka. U istraživanju koje su proveli Amessis-Ouchemoukh i sur. (2014) određen je maseni udio ukupnih flavonoida listova tršlje branih na području Alžira koji iznosi $19,578 \pm 0,326$ mg/g uzorka. Na temelju usporedbe vidljivo je da dobiveni rezultati ovog rada odstupaju od rezultata dobivenog istraživanjem znanstvenika te da je njihova dobivena vrijednost znatno veća. Razlog toga mogu biti drugačiji klimatski uvjeti, geografski položaj te različiti termini berbe. U drugom istraživanju (Cheurfa i sur., 2015), čiji uzorci su također brani na području Alžira, vrijednost ukupnih flavonoida iznosi 8.218 ± 0.009 mg/g uzorka. Usporedimo li tu vrijednost sa dobivenim vrijednostima u ovome radu, vidljivo je da su dobiveni rezultati u skladu sa istraživanjem.

4.2. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Rezultati utjecaja lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina prikazani su grafički na slici 15, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

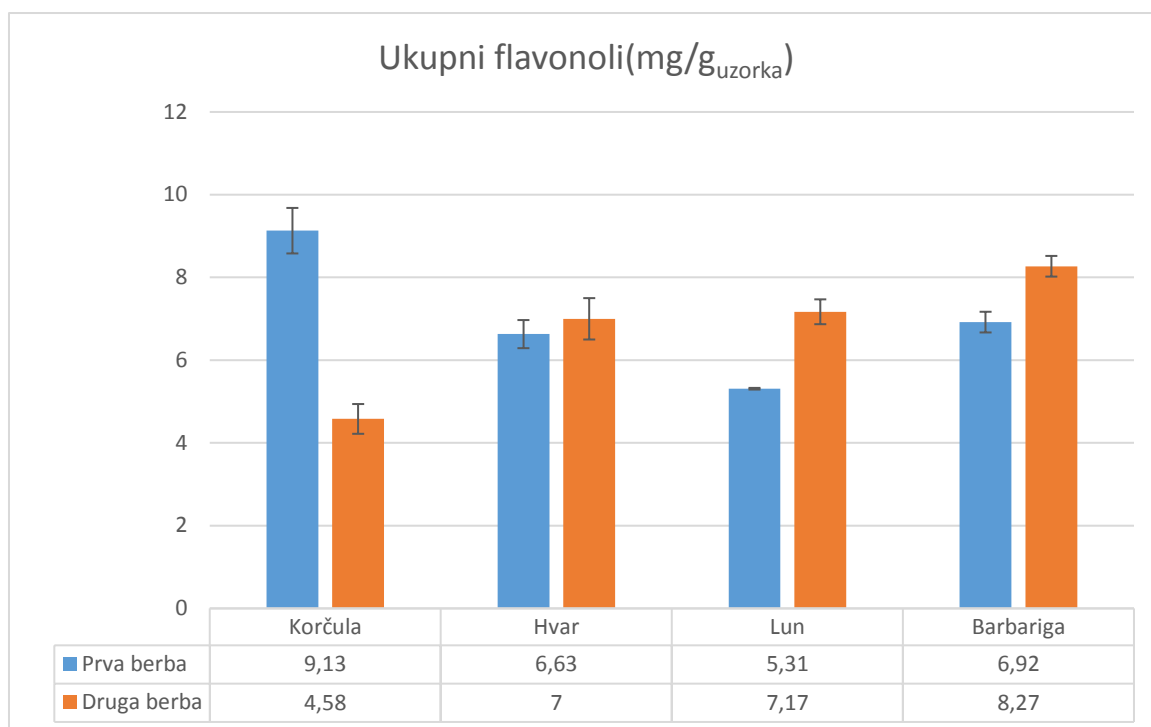


Slika 15. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prvom terminu berbe kreću se od 3,01 mg/g uzorka do 9,85 mg/g uzorka, a u drugom terminu od 5,05 mg/g uzorka do 7,73 mg/g uzorka. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je s obzirom na lokaciju u prvom terminu berbe najveći udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen na Korčuli te iznosi 9,85 mg/g uzorka, potom na Hvaru (7,84 mg/g uzorka), Barbarigi (7,21 mg/g uzorka) te Lunu (3,01 mg/g uzorka). Vidljivo je da su s obzirom na lokaciju u drugom terminu berbe, a u odnosu na prvi termin berbe, na Korčuli i Hvaru maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina manji te iznose 5,05 mg/g uzorka i 6,84 mg/g uzorka. Na lokacijama Lun i Barbariga, rezultati pokazuju suprotno, odnosno maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina veći su u drugom terminu berbe i iznose 7,19 mg/g uzorka i 7,73 mg/g uzorka. U Istraživanju (Botsaris i sur., 2015) određen je maseni udjel hidroksicimetnih kiselina lista tršlje brane na području Cipra. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od $8,4 \pm 0,3$ mg/g uzorka do $16,5 \pm 0,7$ mg/g uzorka ovisno o korištenom otapalu za ekstrakciju. Vrijednosti dobivene na području Cipra znatno su veće nego one dobivene na području Hrvatske te se može pretpostaviti da su uzrok toga, kao i kod koncentracije ukupnih flavonoida, različiti klimatski uvjeti, termini berbe kao i korištenje različitih otapala za ekstrakciju.

4.3. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonola

Rezultati utjecaja lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonola prikazani su grafički na slici 16, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.



Slika 16. Utjecaj lokacije i termina berbe na koncentraciju ukupnih flavonola

Maseni udjeli ukupnih flavonola u prvom terminu berbe kreću se od 5,31 mg/g uzorka do 9,13 mg/g uzorka, a u drugom terminu od 4,58 mg/g uzorka do 8,27 mg/g uzorka. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je s obzirom na lokaciju u prvom terminu berbe najveći udio ukupnih flavonola zabilježen na Korčuli te iznosi 9,13 mg/g uzorka, potom na Barbarigi (6,92 mg/g uzorka), Hvaru (6,63 mg/g uzorka) te Lunu (5,31 mg/g uzorka). Vidljivo je da je s obzirom na lokaciju u drugom terminu berbe, a u odnosu na prvi termin berbe, na Korčuli maseni udio ukupnih flavonola manji te iznosi 4,58 mg/g uzorka. Na lokacijama Hvar, Lun i Barbariga, rezultati pokazuju suprotno, odnosno maseni udjeli ukupnih flavonola veći su u drugom terminu berbe i iznose 7 mg/g uzorka, 7,17 mg/g uzorka, 8,27 mg/g uzorka.

Prema Amessis-Ouchemoukh i sur. (2014) maseni udjel ukupnih flavonola listova tršlje brane na području Alžira iznosi $7,29 \pm 0,24$ mg/g uzorka. Uspoređujući rezultate ovoga rada sa rezultatom dobivenog istraživanjem moguće je utvrditi da su dobiveni rezultati u skladu s navedenim istraživanjem.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedene analize, rezultata i rasprave možemo zaključiti:

- Određeni su značajni maseni udjeli flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista tršlje sa područja Hrvatske, a čija vrijednost ovisi o terminu berbe i lokaciji uzgoja.
- U drugom terminu berbe, u odnosu na prvi termin berbe, uočeno je smanjivanje koncentracija ispitivanih fenolnih spojeva na Korčuli, dok je na lokacijama Hvar, Lun, Barbariga uočen porast koncentracija ili se koncentracije nisu znatno mijenjale.
- Najveća koncentracija ukupnih flavonoida u prvom terminu berbe zabilježena je na Korčuli i iznosi 8,71 mg/g uzorka. Nasuprot tome, u drugom terminu berbe, na Korčuli je određena najniža koncentracija (3,96 mg/g uzorka), dok je najviša koncentracija zabilježena na Hvaru i iznosi 8,62 mg/g uzorka.
- Najveća koncentracija hidroksicimetnih kiselina u prvom terminu berbe određena je na Korčuli i iznosi 9,85 mg/g uzorka. U drugom terminu berbe, a ovisno o lokaciji, najviša koncentracija zabilježena je na Barbarigi (7,73 mg/g uzorka), dok je najmanja zabilježena na Korčuli (5,05 mg/g uzorka).
- Najveća koncentracija flavonola u prvom terminu berbe određena je na Korčuli i iznosi 9,13 mg/g uzorka. Suprotno tome, u drugom terminu berbe, na Korčuli je zabilježena najniža koncentracija (4,58 mg/g uzorka), dok je najviša koncentracija zabilježena na Barbarigi i iznosi 8,27 mg/g uzorka.

6. LITERATURA

1. Abdelwahed A., Bouhleb I., Skandrani I., Valenti K., Kadri M., Guiraud P., Steiman R., Mariotte A. M., Ghedira K., Laporte F., Dijoux-Franca M.G., Chekir-Ghedira L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. *Chemico-Biological Interactions*. **165**(1): 1–13.
2. Amessis-Ouchemoukh N., Madani K., Falé P. L. V., Serralheiro M. L., Araújo M. E. M. (2014) Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. **53**: 6–15.
3. Anonymous 1 (2015) < <https://www.plantea.com.hr/trslja/#> > Pristupljeno 14. lipnja 2018.
4. Assimopoulou A. N., Zlatanov S. N., Papageorgiou V.P. (2005) Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrate. *Food chemistry*. **92**(4): 721–727.
5. Azaiz H., Halahleh F., Abbas N., Markovics A., Muklada, H., Ungar E.D., Landau S.Y. (2013) Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Vet parasitol*. **191**: 44–50.
6. Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F. R., Ortuno A., Del Rio J. A. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**: 4505–4515.
7. Berg K.J.V.D., Horst J.V.D., Boon J.J., Sudeijer O.O. (1998) Cis-1, 4-poly- β -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Letters*. **39**(17): 2645–2648.
8. Bhour W., Derbel S., Skandrani I., Boubaker J., Bouhleb I., Sghaier M.B., Kilani S., Mariotte A.M., Dijoux-Franca M.G., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. (2009) Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*. **24**(2): 509–15.
9. Botsaris G., Orphanides A., Evgenia Yiannakou E., Vassilis Gekas V., Goulas V. (2015) Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Extracts in Pork Sausages. *Food Technol. Biotechnol*. **53**(4): 472–478.
10. Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Surmaghi M.H.S., 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*. 1-33.
11. Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. **56**: 317–333.
 12. Brodowska K. M. (2017) Natural flavonoids: classification, potential role and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*. **7**(2): 108-123.
 13. 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. *Journal of Food and Drug Analysis*. **10**(3): 178-182.
 14. Cheurfa M, Allem R. (2015) Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **25**(2): 142–144.
 15. Congiu R., Falconieri D., Marongiu B., Piras A., Porcedda S. (2002) Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**(4): 239–244.
 16. Douissa F.B., Hayder N., Ghedira L.K., Hammami M., Ghedira K., Mariotte A.N. (2005) New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and fragrance journal*. **20**: 410-414.
 17. Harborne J.B., Baxter H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chicester.
 18. Harborne J.B., Williams C.A. (2002) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.
 19. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572–584.
 20. Hostetler G.L., Ralston, R.A., Schwartz, S.J. (2017) Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. **8**(3): 423–435.
 21. Howard L.R., Clark J.R., Brownmiller C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **83**(12): 1238-1247.
 22. Janakat S, Al-Merie H. (2002) Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*. **83**: 135-138.
 23. Kazazić S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. **55**: 279-290.

24. Kivçak B., Akay S. (2005) Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*. **76**(1): 62–66.
25. Kizil S., Turk M. (2010) Microelement contents and fatty acid compositions of *Rhus coriaria* L. and *Pistacia terebinthus* L. fruits spread commonly in the South Eastern Anatolia region of Turkey. *Natural Product Research*. **24**(1): 92–98.
26. Kottakis F., Kouzi K.K., Pendas S., Kountouras J., Choli P.T. (2009) Effects of mastic gum *Pistacia lentiscus* var. Chia on innate cellular immune effectors. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. **21**(2): 143-149.
27. 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.
28. Lafay S, Gil-Izquierdo A. (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*. **7**: 301-311.
29. 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. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **8**(3): 360–364.
30. Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. (1990) Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
31. Miller N.J., Ruiz-Larrea M.B. (2002) Flavonoids and Other Plant Phenols in the Diet: Their Significance as Antioxidants. *J. Nutritional & Enviromental Medicine*. **12**: 39-51.
32. Naczki M., Shahidi F. (2006) Phenolics in cereal, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 1523-1542.
33. Nahida, Ansari S.H., Siddiqui A.N. (2012) *Pistacia Lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **4**(4): 16-20.
34. Rhodes L., Maxted N. (2016) *Pistacia lentiscus*. The IUCN Red List of Threatened Species. < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T202960A47600695.en>. > Pristupljeno 24. lipnja 2018.
35. Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*. **66**: 401-436.
36. Rodríguez-Perez C., Quirantes-Piñe R., Amessis-Ouchemoukh N., Khodir M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2013) A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **77**: 167-174.

37. Romani, 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. *Phytochemical Analysis*. **13**(2): 79–86.
38. Tolić I. (2003) Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda pistacija. *Šumarski list*. **9**(10): 501-507.
39. Trabelsi H., Cherif O.A., Sakouhi F. (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.
40. Trabelsi H., Lajnef H.B., Arfa K.B., Boukhchina S. (2016) Phenolic Compounds Characterization from *Pistacia lentiscus* (lentisc) Fruit. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **8**(8): 1-8.
41. Tsao R., McCallum J. (2009) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability, De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ur., Blackwell Publishing Ltd. str. 131-153.
42. Vojin Gligić (1953) Etimološki botanički rečnik, Sarajevo „Veselin Masleša“
43. Wyllie S.G., Brophy J.J., Sarafis V., Hobbs M. (1990) Volatile Components of the Fruit of *Pistacia Lentiscus*. *Journal of Food Science*. **55**(5): 1325-1326.
44. Yemmen M., Landolsi A., Hamida J.B., Mégraud F., Trabelsi Ayadi M. (2017) Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia. *Cellular and molecular biology*. **63**(9): 87-95.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Negla Surak
ime i prezime studenta