

Fitokemijski sastav i antioksidacijski potencijal latica odabranih cvjetnica

Vukres, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:874263>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Vukres

**Fitokemijski sastav i antioksidacijski
potencijal latica i tepala odabranih cvjetnica**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Vukres

**Phytochemical content and antioxidant
potential of petals and tepals of selected
flowering plants**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Šola. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

FITOKEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL LATICA I TEPALA ODABRANIH CVJETNICA

Ana Vukres

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biljke su zauzele različite aspekte našega života, koristimo ih u kozmetici, medicini, kao začine i hranu, kao bojila te u industriji ulja. Industrijska je praksa upotrebljavati određeni dio biljke, dok se ostali dijelovi uglavnom zanemare i ne iskorištavaju. S ekološkog i ekonomskog aspekta, takav način „djelomičnog“ iskorištavanja biljaka nije održiv. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti kvalitativni i kvantitativni sastav bioaktivnih spojeva, te antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata tepala/latica šafrana, šumskog sljeza, pravog duhana, suncokreta i ljekovitog nevena kako bi se doprinijelo boljem razumijevanju biopotencijala ovog biljnog materijala. Spektrofotometrijski je određen udio različitih skupina bioaktivnih spojeva, te antioksidacijski kapacitet ekstrakata. Ekstrakti tepala šafrana sadrže značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i proantocijanidina u odnosu na ostale analizirane uzorke. 70%-tni etanolni ekstrakt duhana sadrži više ukupnih flavonoida u odnosu na ostale istraživane cvjetnice. Najveći udio ukupnih flavonoida u 40%-tnom etanolu imali su ekstrakti latica suncokreta. Značajno veći udio karotenoida zabilježila sam kod ekstrakata latica nevena i suncokreta. U sve tri korištene metode mjerenja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima s 40%-tnim etanolom laticе suncokreta i sljeza imale su najviše vrijednosti, dok su u ekstraktima sa 70%-tnim etanolom laticе suncokreta bile najučinkovitije. Na temelju ovoga zaključujem da su laticе suncokreta i sljeza bogatije antioksidansima od ostalih uzoraka.

Ključne riječi: biljni metaboliti, fenolne kiseline, flavonoidi, spektrofotometrija, šećeri
(59 stranica, 26 slika, 1 tablica, 129 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Šola

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Ivana Šola

Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 8. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PETALS AND TEPALS OF SELECTED FLOWERING PLANTS

Ana Vukres

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Plants have occupied different aspects of our life, we use them in cosmetics, medicine, as spices and food, as dyes and in oil the industry. Most of these plants are known for one of their plant organs, and these are generally not flowers, petals and tepals. It is industrial practice to use a certain part of the plant while the other parts are mostly ignored and not used. From an ecological and economic point of view, „partial“ exploitation of plants is not sustainable. The aim of this thesis was to compare the qualitative and quantitative composition of bioactive compounds, and the antioxidant potential of ethanolic extracts of tepals/petals of saffron, common mallow, real tobacco, sunflower and medicinal calendula in order to contribute to a better understanding of the biopotential of this plant material. The proportion of different groups of bioactive compounds and the antioxidant capacity of the extracts were determined spectrophotometrically. Saffron tepal extracts contained a significantly higher proportion of total phenolic compounds, hydroxycinnamic acids, flavonols and proanthocyanidins compared to other analyzed samples. The 70% ethanol extract of tobacco contained more total flavonoids compared to other investigated flowering plants. Sunflower petal extracts had the highest proportion of total flavonoids in 40% ethanol. I noted a significantly higher proportion of carotenoids in the extracts of marigold and sunflower petals. In all three used methods of measuring antioxidant capacity, sunflower and common mallow petals had the highest values in extracts with 40% ethanol, while sunflower petals were the most effective in extracts with 70% ethanol. Based on this, I conclude that sunflower and common mallow petals are richer in antioxidants than other samples.

Key words: flavonoids, phenolic acids, plant metabolites, spectrophotometry, sugars
(59 pages, 26 figures, 1 table, 129 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library.

Mentor: Asst. Prof. Ivana Šola, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Ivana Šola, PhD

Assoc. Prof. Ivana Maguire, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Thesis accepted: 8th September 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Latice i tepale	1
1.2. Duhan – <i>Nicotiana tabacum</i> L.	2
1.3. Suncokret – <i>Helianthus annuus</i> L.	4
1.4. Šumski sljez – <i>Malva sylvestris</i> L.	5
1.5. Ljekoviti neven - <i>Calendula officinalis</i> L.	7
1.6. Šafran - <i>Crocus sativus</i> L.	8
1.7. Specijalizirani biljni metaboliti	10
1.7.1. Fenolni spojevi	12
1.7.1.1. Flavonoidi	14
1.7.1.2. Fenolne kiseline	15
1.7.1.3. Tanini	16
1.8. Šećeri.....	18
1.9. Fotosintetski pigmenti.....	20
1.9.1. Karotenoidi i porfirini	20
1.10. Slobodni radikali i antioksidansi.....	22
1.11. Cilj rada.....	23
2. MATERIJALI I METODE	25
2.1. Materijali.....	25
2.2. Metode	26
2.2.1. Priprema ekstrakata	26
2.2.2. Određivanje ukupnih fenola	26
2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida	27
2.2.4. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli	28
2.2.5. Proantocijanidini	29

2.2.6. Topivi šećeri.....	29
2.2.7. Karotenoidi i porfirini	30
2.2.8. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	31
2.2.9. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	31
2.2.10. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP.....	32
2.2.11. Statistička obrada podataka.....	33
3. REZULTATI.....	34
3.1. Ukupni fenoli	34
3.2. Ukupni flavonoidi	35
3.3. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli	36
3.4. Ukupni proantocijanidini	38
3.5. Topivi šećeri.....	38
3.6. Karotenoidi i porfirini	39
3.7. Antioksidacijski kapacitet odabranih cvjetnica	40
3.7.1. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	40
3.7.2. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	41
3.7.3. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP	42
4. RASPRAVA.....	43
5. ZAKLJUČAK	48
6. LITERATURA.....	49
7. ŽIVOTOPIS	59

1. UVOD

1.1. Latice i tepale

Cvijet je kratki dio izdanka, ograničena rasta koji nosi organe namijenjene spolnoj reprodukciji i sterilne dodatke. U tipičnom kontekstu cvijet se sastoji od sterilnih i fertilnih dijelova. Sterilni dijelovi cvijeta su cvjetišta i ocvijeće koje se sastoji od čaške i vjenčića. Fertilni dijelovi cvijeta su andrecej i ginecej. Ocvijeće (perijant) je skup bazalnih sterilnih cvjetnih listića jednog cvijeta i ima dvije uloge, a to su zaštita unutarnjih dijelova cvijeta i podrška oprašivanju (Nikolić 2017).

Latice (petale) jednog cvijeta grade vjenčić (korolu). Vjenčić je najčešće najuočljiviji dio cijele biljke te njegova građa, boja i oblik razvijeni su zbog privlačenja oprašivača. Latice i vjenčić također imaju zaštitnu ulogu, tj. štite unutarnje fertilne dijelove cvijeta. Latice mogu biti vrlo raznolikog oblika, čak i unutar istog cvijeta. Uobičajeno su eliptične, vretenaste, jajaste i obrnuto jajaste. Latice su obično slojevitog oblika i najčešće većih dimenzija i nježnije građe od lapova. Lapovi su modificirani listovi dok je podrijetlo latica nešto složenije (Nikolić 2017).

Nježnija anatomska građa latica posljedica je različite anatomske strukture u odnosu na lapove i prave listove. Cijela latica uobičajeno sadrži 3-4 sloja stanica zatvorenih unutar epiderme kroz koje prolazi niz nježnih provodnih snopova. Epidermalne stanice mogu biti produljenje i graditi ispupčenja ili papile. Papile epiderme utječu na refleksiju svjetlosti, hidrofobnost te osjetilni doživljaj kukaca oprašivača (Whitney i sur. 2011). Kod nekih cvjetova latice su glatke i sjajne što je posljedica glatkoće epiderme latica i izlučenih masnih ulja na površini epiderme (Nikolić 2017).

Boja latica kontrolirana je različitim pigmentima. Boja vjenčića može imati različito podrijetlo. U ranijim fazama vjenčić je od klorofila svijetlozelene boje, a kasnije dolazi do promjene pigmentnog sastava. Refleksijom unutarstaničnih prostora može doći do doživljaja bijele boje. Himokromi su pigmenti otopljeni u citoplazmi ili vakuolama. Najčešće su pohranjeni u epidermi i daju crveno-ljubičasto-plavu (antocijani), žutu (antoksantini), smeđocrnu (melanini) boju. Plazmokromi su pigmenti vezani uz plastide, posebice kloroplaste (žuti i crveni karotenoidi) (Nikolić 2017, Zhao i sur. 2012). Latice ne moraju imati istu boju tijekom cijelog razdoblja cvjetanja. Latice obojene antocijanima zbog promjene pH vrijednosti mogu imati promjene boje od ružičaste, preko plave u ljubičastu. Na promjenu boje cvijeta može utjecati i oprašivanje. Naime, tamnjenje cvjetova kukcima signalizira da su ovi cvjetovi već posjećeni i bez nektara. Bijela, žuta, ružičasta i ljubičasta boja cvjetova

dominiraju i pojavljuju se u 70% porodica. Boje i šare latica često reflektiraju svjetlost valnih duljina nevidljivih ljudskom oku (Wessinger i Rausher 2012).

Latice nerijetko oslobađaju i miris, što može biti obilježje i drugih dijelova cvijeta i biljke. Miris oslobađaju mirisne žlijezde ili osmofori, tj. specijalizirane žljezdane stanice ili žljezdana tkiva (Adler 2012).

Ocvijeće koje nije razlučeno na čašku i vjenčić naziva se homohlamidejsko ocvijeće ili perigon. Ovo ocvijeće grade tepale. Morfologija i anatomija tepala načelno se ne razlikuje od morfologije i anatomije petala. Tepale se za cvjetišće drže širokom osnovom, a opskrbljene su s tri ili više žilnih snopova. Često na sebi imaju diferencirane raznolike oblike nektarija nalik onima na petalama (Nikolić 2017).

Perigoni se pojavljuju u tri glavna oblika: petaloidni perigon (sve su tepale jednake i nalikuju vjenčiću), sepaloidni perigon (sve su tepale jednake, ali nalik lapovima tj. čašci), heterotepalni perigon (tepale vanjskog i unutarnjeg ciklusa međusobno se razlikuju) (Nikolić 2017).

1.2. Duhan – *Nicotiana tabacum* L.

Nicotiana tabacum (Slika 1.) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Solanaceae. Naraste do 2,5 m s velikim jajastim zelenim listovima, a cvat joj se sastoji od terminalnih nakupina cjevastih bijelo–ružičastih cvjetova (Al-Lahham i sur. 2020). Svi dijelovi biljke ljepljivi su i prekriveni kratkim viskozno-žljezdastim dlakama koje izlučuju žuti sekret koji sadrži nikotin (Sharma i sur. 2016). Izvorno područje duhana je tropska i subtropska Amerika, ali danas je to širom svijeta kultivirana biljna vrsta i jedna od komercijalno najznačajnijih poljoprivrednih kultura u svijetu zbog svoje primjene u industriji cigareta (Nasr i sur. 2014). Tradicionalno, vrsta *Nicotiana rustica* korištena je kod Indijanaca u ceremonijalne i ljekovite svrhe i smatra se „tradicionalnim“ duhanom. Duhan je napravljen od lišća biljke *Nicotiana tabacum*. Duhanski dim je ozbiljna prijetnja za zdravlje te je to složena i reaktivna smjesa koja sadrži oko 5000 komponenti (Talhout i sur. 2011). Ova otrovna i kancerogena smjesa duhanskog dima vjerojatno je najznačajniji izvor raka pluća koji je u svijetu najčešći zloćudni tumor i najčešći uzrok smrti od raka u posljednjih nekoliko desetljeća (Wong i sur. 2017). Prema istraživanju Saitoh i sur. (1984) svih 60 istraženih vrsta *Nicotiana* sadrže alkaloidne, a količina i omjer ukupnih i pojedinačnih alkaloida prisutnih u

biljci ovise o vrsti. Četiri glavna alkaloida nakupljena u duhanu su nikotin, nornikotin, anabasin i anatabin, a u mnogim vrstama nikotin je glavni alkaloid. Nikotin čini više od 90% sadržaja alkaloida, dok nornikotin i anatabin čine većinu ostatka (Kaminski i sur. 2020). S druge strane, *Nicotiana tabacum* ima dugu povijest narodne medicine u nekim azijskim zemljama. U kineskoj narodnoj medicini *Nicotiana tabacum* koristi se kao instekticid, anestetik, sedativ i emetik (Chen i sur. 2012), a lišće duhana poznato je po antibakterijskoj, antiAlzheimerovoj i antinociceptivnoj aktivnosti (Wong i sur. 2017). S obzirom da je duhanski dim glavni čimbenik rizika za rak pluća malo je istraživanja koja se bave biološkim svojstvima duhana poput antibakterijskih, antikancerogenih i antioksidativnih. Također, većina takvih istraživanja usredotočila se na lišće vrste *Nicotiana tabacum* (Al-Lahham i sur. 2020). Preko 20% biljke duhana se odbacuje nakon prerade, zagađujući okoliš, a zapravo je odbačeno lišće duhana ekonomski vrijedno zbog bioaktivnih spojeva u sebi, poput polifenola, proteina i aromatskih spojeva (Ru i sur. 2012). Nedavna istraživanja su dokazala da odbačena stabljika također ima antioksidativno i antimikrobno djelovanje u vodenom i metanolnom ekstraktu (Sharma i sur. 2016). Ova istraživanja izvršena su zbog pružanja znanstvenog obrazloženja za uporabu ostalih dijelova biljke duhana koji se inače odbacuju kao otpad.



Slika 1. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) (preuzeto s

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:817077-1#publications>)

1.3. Suncokret – *Helianthus annuus* L.

Helianthus annuus L. (Slika 2.), suncokret, je poljoprivredno važna vrsta koja potječe iz Sjeverne Amerike, a pripada porodici Asteraceae, glavočike (Alagawany i sur. 2015). Suncokret je porijeklom iz američkih plemena koja su pripitomila usjev 1000 godina prije Krista te ga proširila prema istoku i jugu Amerike. Prvi uzgoj vrste *Helianthus annuus* bio je u južnoj Kanadi i Meksiku, a danas se ova vrsta komercijalno uzgaja po cijelom svijetu (Al-Shukaili i Hossain 2019). *Helianthus annuus* je visoka jednogodišnja cvjetnica koja cvjeta krajem ljeta i početkom jeseni te se uzgaja u svim podnebljima zbog jestivog ulja i sjemenki. To je biljka s mnogo žutih, narančastih cvjetova, a smatra se uljarskom kulturom zbog sjemena koje sadrži ulje (Dimitrijević i sur. 2017). Nekoliko istraživanja je pokazalo da su ekstrakti biljke *Helianthus annuus* bogati izvor ugljikohidrata, flavonoida, toksičnih alkaloida, saponina, glikozida, fitosterola, steroida i ulja (Marmesat i sur. 2012). Drugi kemijski spojevi odgovorni za biološki potencijal poput vitamina B, oksalne kiseline, vitamina C, kofeinske kiseline i klorogenske kiseline također su pronađeni u biljci suncokreta (Karamać i sur. 2012). Istraživanja sa ekstraktima *Helianthus annuus* u organskim otapalima pokazala su antimikrobni potencijal protiv različitih vrsta Gram (+) i Gram (-) bakterija (Mashwani i sur. 2015). Uljarske kulture, uključujući *Helianthus annuus* L., od davnina se koriste za liječenje različitih ljudskih bolesti (Al-Shukaili i Hossain 2019). Lišće suncokreta ima široku tradicionalnu primjenu, tako se čaj koristi kao ekspektorans i diuretik, te za snižavanje temperature (Bester i sur. 2010), a osušeni prah lišća koristi se za liječenje otekline, ugriza zmija i pauka (Fisk i sur. 2006). S druge strane, čajna infuzija cvijeta suncokreta koristi se za liječenje malarije i plućnih bolesti (Luka i sur. 2013). Liang i sur. (2013) otkrili su sastav fenolnih spojeva cjevastih i jezičastih cvjetova suncokreta. Otkriveno je da su glavne komponente derivati hidroksicimetne kiseline sa 1,5- dikafeoikvinskom kiselinom te da ti isti spojevi najviše doprinose antioksidativnom djelovanju ekstrakata cvjetova suncokreta. Što se tiče sjemenki i korijena, tradicionalno se koriste kao diuretik i ekspektorans te za liječenje reumatskih bolova (Bester i sur. 2010). Fenolni spojevi su uglavnom odgovorni za antioksidativni potencijal sjemenki suncokreta (Amakura i sur. 2013). Mlade biljke mogu također biti vrijedan poljoprivredni materijal. Zelene biljke suncokreta koriste se kao stočna hrana i izvor silaže zbog njihove nutritivne vrijednosti te visokog sadržaja proteina i masti (Peiretti i Meineri 2010). Suncokret (*Helianthus annuus*), četvrti je najvažniji izvor jestivih biljnih ulja u svijetu te doprinosi do 12% proizvedenog jestivog ulja u svijetu (Rauf i sur.

2017). Sjemenke suncokreta su široko korištene u prehrambenoj i neprehrambenoj industriji (biogoriva, maziva, površinski aktivne tvari, sinteza polimera) zbog visokog udjela ulja i bjelančevina te drugih vrijednih bioaktivnih komponenti. Najzastupljenije masne kiseline u suncokretovom ulju su linolna kiselina (oko 65%), oleinska kiselina (oko 25%) i palmitinska i stearinska kiselina (svaka oko 5%) (Amakura i sur. 2013). Također, suncokretovo ulje sadrži visoku razinu tokoferola i fitosterola (Rashid i sur. 2009).



Slika 2. Suncokret (*Helianthus annuus* L.) (preuzeto s <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:119003-2>).

1.4. Šumski sljez – *Malva sylvestris* L.

Šumski sljez (*Malva sylvestris* L.) (Slika 3.) pripada porodici Malvaceae, sljezovke. Ova biljka, zeljasta je trajnica sa lila-ljubičastim cvjetovima prošaranim tamnim žilama tijekom proljeća i ranog ljeta. Sljez je visine 60 do 90 cm te ima listove velike, mekane i široke u obliku srca (Kumar i sur. 2014). *Malva sylvestris* raste samoniklo u mnogim zemljama, a porijeklom je iz Europe, Sjeverne Amerike i Azije (Camejo-Rodrigues i sur. 2003). Vrsta *Malva sylvestris* koristi se u mediteranskoj i europskoj tradicionalnoj medicini za liječenje vanjskih i unutarnjih upala te ozljeda. Kao antioksidant i sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala vodi do zaštite bioloških molekula protiv oksidacije. Ekstrakt ove biljke može imati i protuupalni učinak (Barros i sur. 2010). *Malva sylvestris* liječi nekoliko tjelesnih sustava poput probavnog, respiratornog, mišićnog i koštanog sustava, te se koristi kod poremećaja kože i ozljeda. Tako se primjerice ističe djelovanje ove biljke kao diuretika, laksativa, spazmolitika i koleretika. Također se koristi kao bronhodilatator, ekspektorant,

protiv dijareje i preporučuje se za njegu akni te kao antiseptik (Quave i sur. 2008). Zbog nutritivnog potencijala i kemijskog sastava biljke koriste se različiti dijelovi – lišće, cvjetovi, nezreli plodovi i lisnate cvjetne stabljike (Barros i sur. 2010). Ovi dijelovi biljke koriste se za različite pripravke infuzija, dekokcija, obloga, losiona i kupki. Također, ova biljka koristi se od davnina, te su još Grci i Rimljani tvrdili za njena laksativna svojstva (Novais i sur. 2004). Biološka aktivnost ove biljke može se pripisati antioksidantima, poput polifenola, vitamina C, vitamina E, β -karotena i drugih važnih fitokemikalija (Barros i sur. 2010). Između svih ovih antioksidanasa, vitamin C (askorbinska kiselina) igra važnu ulogu u održavanju homeostaze ROS-a (Reactive Oxygen Species) putem enzimatskih i neenzimatskih reakcija tako da djeluje u različitim staničnim odjeljcima. U šumskom sljezu također su prisutni tokoferoli, poznatiji kao vitamin E. Od četiri oblika tokoferola (α , β , γ i δ), α -tokoferol je glavni oblik vitamina E koji je bitna dijetalna komponenta sisavaca. α -tokoferol je prisutan u zelenim biljnim tkivima i ima najveću aktivnost vitamina E (Caretto i sur. 2010). Biljke, tako i vrsta *Malva sylvestris* sintetiziraju linolnu i linolensku kiselinu, nezasićene masne kiseline koje sisavci ne mogu sintetizirati, a važne su im poput vitamina za rast i razvoj (Barros i sur. 2010). Unatoč tome, provedena istraživanja u Europi zabilježila su da je šumski sljez vrsta kojoj je upotreba danas na rubu nestanka (Novais i sur. 2004). Također, analitički podaci o kemikalijama i ukupnom fenolnom sadržaju ove vrste vrlo su rijetki, a s obzirom da se ova vrsta konzumira i cijenjena je zbog svojih nutritivnih i ljekovitih sposobnosti u nekim zemljama, važno je proučiti antioksidanse, fitokemijski sastav te antimikrobno djelovanje jestivih dijelova (lišća i stabljika) i nejestivih dijelova (cvijeće i sjeme) ove vrste (Beghdad i sur. 2014).



Slika 3. Šumski sljez (*Malva sylvestris* L.) (preuzeto s <https://powo.science.keew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:561932-1/images>).

1.5. Ljekoviti neven - *Calendula officinalis* L.

Ljekoviti neven, *Calendula officinalis* L. (Slika 4.) jednogodišnja je biljka iz porodice Asteraceae (glavočiike) koja naraste do 30-40 cm. *Calendula officinalis* važna je vrsta roda *Calendula* te je poznata po svojim ljekovitim svojstvima (Mishra i sur. 2018). Neven se stoljećima uzgajao u ukrasnim vrtovima, gdje lako raste u siromašnim tlima, a poznat je i kao lončanica te se uzgajao kao hrana i ljekovita biljka još od srednjeg vijeka (Efstratiou i sur. 2012). Neven je porijeklom iz Azije i južne Europe (Basch i sur. 2006), a naziv *Calendula* dobiven je od latinske riječi „calends“ što znači „svaki mjesec“. Prema rimskom kalendaru ova riječ je označavala početak novog mjeseca te je to bilo vrijeme kada je neven bio u punom cvatu. Neven je biljka koja svoje cvjetove otvara ujutro, a zatvara navečer te se zbog toga naziva i „biljkom sunca“. Zbog svojeg različitog sastava i ekonomske vrijednosti, uzgoj nevena se povećava (Basch i sur. 2006). Žuti odnosno zlatno-narančasti cvjetovi nevena koriste se kao začim, čaj i lijek (Ćetković i sur. 2004). Mogu se koristiti kao svježi ili sušeni, te se od njih pripremaju čajevi, tinkture, masti i kreme (Vidal-Ollivier i sur. 1989). Ekstrakti nevena se mogu primjenjivati izvana za liječenje ulceracija, ekcema i konjunktivitisa, te iznutra kod čira na želudcu i upala za smirivanje boli zahvaljujući svojim protuupalnim, ljekovitim i antiseptičkim svojstvima (Tanaka i sur. 2009). Neven se široko koristi lokalno za liječenje infekcija kože, opekline, uboda pčela i opekline od sunca (Basch i sur. 2006). Terapeutska svojstva nevena pripisuju se raznolikom sadržaju aktivnih tvari (Muley i sur. 2009), među kojima se ističu fenolni spojevi (flavonoidi i fenolne kiseline) i saponini kojima neven obiluje (Sindhu 2010). *Calendula officinalis* također sadrži karotenoidne pigmente (Kishimoto i sur. 2005) za koje se pokazalo da zajedno sa polinezasićenom masnom kiselinom, poput kalendinske kiseline (Muley i sur. 2009) imaju upalna svojstva *in vivo* i inhibicijska svojstva *in vitro* (Preethi i Kuttan 2009). Ljekoviti neven sadrži veliki broj karotenoida kao što su flavoksantin, rubiksantin, β -karoten, likopen (Pintea i sur. 2003) i lutein koji se iz cvjetova iskorištava kao njegov komercijalni izvor (Mishra i sur. 2018). Ostale tvari identificirane u ekstraktima nevena su proteini i aminokiseline, zasićeni ugljikovodici, vitamin C i mineralne tvari (Butnariu i Coradini 2012). Provedena istraživanja navode da su cvjetovi i lišće ljekovitog nevena zapravo izvor bioloških aktivnih spojeva. Tako su primjerice Cruceiru i sur. (2020) opisali prisutnost hidroksicimetnih kiseline i flavonola u cvjetovima i lišću nevena. Osim fenola, lišće i cvijeće sadrže saponine i triterpenoide (Ak i sur. 2020), a hidroalkoholni ekstrakti cvijeta sadrže derivate kvercetina i apigenina (Escher i

sur. 2019). Jestivi cvjetovi nevena u srednjovjekovnoj Francuskoj koristili su se za pripremu omleta i salata zbog hranjivih svojstava i bogatog sadržaja kininskom kiselinom i α -tokoferolom (Pires i sur. 2017). Agencija za hranu i lijekove (FDA – Food and Drug Administration) klasificirala je vrstu *Calendula officinalis* kao GRAS (Generally Recognized as Safe – općenito priznato kao sigurno) tvar (Slavov i sur. 2019). Ekstrakt cvijeta i eterično ulje iz cvijeća koristi se u liječenju nekoliko kožnih bolesti i u kozmetičkim proizvodima, a posebno u onima za njegu beba. Postoje mnoge kreme, losioni i dječja ulja dostupna na tržištu koja sadrže različitu količinu ulja vrste *Calendula officinalis* (Mishra i sur. 2018). Eterično ulje jake arome koristi se i za privlačenje insekata koji su važni za oprašivanje (Paolini i sur. 2010), a prašak od latica povremeno se koristi kao jeftina alternativa šafranu za aromatiziranje hrane. Latice ljekovitog nevena mogu se koristiti i kao bojilo za hranu, kozmetiku i prirodnu tkaninu kao što su vuna, pamuk, lan, konoplja i svila (Basch i sur. 2006). *Calendula officinalis* je općepoznata ljekovita biljka te je opsežno proučavana zbog svojih blagotvornih učinaka na ljude.



Slika 4. Ljekoviti neven (*Calendula officinalis* L.) (preuzeto s <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:187894-1/images>).

1.6. Šafran - *Crocus sativus* L.

Crocus sativus L. (Slika 5.) poznat kao šafran je lukovičasta trajnica iz porodice perunika odnosno Iridaceae (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004). Svojtja *Crocus heuffelianus*

Herb. koja je korištena u ovom radu do nedavno se navodila kao jedan od sinonima za *Crocus vernus* ssp. *vernus*. Od ostalih vrsta razlikuje se po specifičnoj tamnoljubičastoj šari srcolikog oblika u vršnom dijelu listova perigona (Milović 2016). Šafran se uzgaja u područjima sa blagom i suhom klimom, primjerice u Španjolskoj, Grčkoj, Turskoj, Francuskoj, Italiji, Egiptu, Indiji, Japanu i Kini, te također u Australiji (Boskabady i Farkhondeh 2016). Ukupna proizvodnja začina procjenjuje se na između 90 i 230 tona godišnje, dok je Iran glavni proizvođač sa ukupno 90% proizvodnje (Caballero-Ortega i sur. 2007, Goupy i sur. 2013). Ime šafran dolazi od arapske riječi „*zafaran*“ što znači žut, a ukazuje na visoki sadržaj karotenoidnog pigmenta u stigmama cvijeta (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004). Zbog te karakteristične žute boje, šafran je poznat kao skupocjeni začim jer zahtjeva intenzivan rad i vrijeme, a još se koristi i za aromatiziranje i bojanje hrane, a rjeđe i kao sastojak parfema (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004). Šafran ima crvenkasto ljubičaste cvjetove oblikovane u lijevak, a listovi su mu zeleni i dlakavi, duljine oko 30 do 45 cm (Tarantilis i sur. 1995). Ova biljka i njezin sastav koriste se u tradicionalnoj medicini za liječenje neurodegenerativnih poremećaja, bolesti koronarnih arterija, respiratornih i gastrointestinalnih bolesti te poremećaja mokraćnog sustava (Boskabady i Farkhondeh 2016). Tradicionalno se još smatra i antidepresivom, antispazmodikom, afrodisijakom, ekspektoransom i sedativom (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004). U Ayurvedskoj medicini se šafran koristio za liječenje kronične bolesti poput astme i artritisa, te za liječenje prehlade i kašlja. Pasta od šafrana može se koristiti kao oblog za modrice i površinske ranice, a Ayurvedski lijekovi koji sadrže šafran koriste se za liječenje akni i nekih kožnih bolesti (Bukhari i sur. 2018). Ispitano je da *Crocus sativus* i njegovi bioaktivni spojevi sadrže antikancerogene, antimikrobne i antimutagene aktivnosti (Bhandari 2015, Premkumar i sur. 2006). Biološki aktivni sastojci latica vrste *Crocus sativus* koji su vjerojatno povezani sa učincima na zdravlje su fenolni spojevi, flavonoidi i antocijani (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004), a terapijski učinak stigme pripisuje se spojevima kao što su krocin koji je također i jedan od glavnih pigmenta za bojanje, glikozid pikrokrocina koji daje posebnu „gorčinu“, krocetin (hidrofobni spoj, glavni metabolit krocina) i safranal koji je glavni faktor arome u šafranu te sadrži oko 60% hlapljivih komponenata šafrana (Hosseinzadeh i Younesi 2002, Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004, Tarantilis i Pollissiou 1997, Lage i Cantrell 2009). U svježem šafranu ta tvar postoji kao stabilni pikrokrocina, no kao rezultat vrućine i s vremenom, odnosno sušenjem raspada se oslobađajući hlapljivi aldehyd, safranal (Abdullaev i Espinosa-Aguirre 2004). Kemijska analiza stigme šafrana pokazala je prisutnost više od 150 komponenti (Samarghandian i Borji

2014), a stigma je zapravo ono što mislimo pod komercijalni šafran. Ima prepoznatljivu i jedinstvenu boju, okus i aromu (Tarantilis i Pollissiou 1997), te skupinu kemijskih spojeva odgovornih za bioaktivna svojstva poput ugljikohidrata, minerala, vitamina (posebno riboflavin i tiamin), aminokiselina, proteina, škroba, a od pigmenata ističu se već spomenuti krocin, antocijani, karoten, likopen i zigzantin (Rios i sur. 1996). Kod kemijske analize tepala vrste *Crocus sativus* ističu se derivati glikozida kvercetina i kemferola kao glavnih spojevi flavonoida (Goli i sur. 2012). U tepalama *Crocus sativus* nedavno je opisana prisutnost alkaloida, tanina, terpenoida, steroida i saponina (Vijender i sur. 2011), a ljubičasta - lila boja cvjetova dolazi od delfinidina i petunidina (Norbaek i sur. 2002). Za jedan kg šafrana potrebno je oko 350 kg cvijeća odnosno 150 000 cvjetova od kojih se koristi samo stigma (Sanchez-Vioque i sur. 2012, Goli i sur. 2012). Latice šafrana glavni su nusproizvod berbe šafrana, a nisu korisne za poljoprivrednike (Goli i sur. 2012). Iz tog razloga bitno je dodatno istražiti ostale dijelove biljke kako bi se smanjilo bacanje biljnog viška.



Slika 5. Šafran (*Crocus sativus* L.) (preuzeto s <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:436688-1/images>).

1.7. Specijalizirani biljni metaboliti

Metabolizam biljaka dijeli se na primarni i sekundarni metabolizam. Iz primarnog metabolizma potječu lipidi, proteini, ugljikohidrati i nukleinske kiseline – tvari koje su zajedničke živim bićima i bitne za održavanje stanica. S druge strane, rezultat sekundarnog metabolizma su tvari koje potječu iz nekoliko biosintetskih puteva i ograničene su na određene skupine organizama (Reis Giada 2013). Primarni metabolizam obuhvaća sve

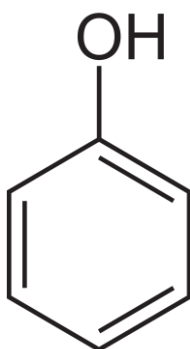
procese bitne za rast i razvoj, dok je sekundarni metabolizam neophodan za preživljavanje pojedinca u njegovom okruženju (Hartmann 2007). Budući da je metabolizam neophodan za rast i razvoj, njegove se komponente mogu kontinuirano mijenjati i prilagođavati zahtjevima koji se neprestano mijenjaju zbog pritiska okoliša (Hartmann 2007).

Biljni specijalizirani metaboliti uključuju širok spektar spojeva koji danas broji više od 200 000 definiranih struktura. Specijalizirani metabolizam biljaka pokriva sve fiziološke i biokemijske aspekte sekundarnih produkta, kao i funkcionalne i evolucijske aspekte (Hartmann 2007). S obzirom da akumulacija specijaliziranih metabolita ovisi o raznim čimbenicima okoliša kao što su svjetlost, temperatura, voda u tlu, plodnost i slanost tla (Yang i sur. 2018), specijalizirani metabolizam igra glavnu ulogu u prilagodbi biljaka na okoliš i te su tvari opisane kao antibiotici i antimikotici, a imaju i antivirusno djelovanje te mogu zaštititi biljke od patogena (fitoaleksini) i toksina koje ispuštaju susjedne biljke (alelopatija). Osim toga, specijalizirani biljni metaboliti apsorbiraju UV i tako sprječavaju ozbiljna oštećenja lišća od svjetlosti (Bourgaud i sur. 2001). Djeluju i na životinje, poput insekata (svojstva protiv hranjenja) ili na goveda koja se hrane djetelinom i lucernom te na taj način izražavaju estrogena svojstva i djeluju na plodnost (Harborne 1999). Zapravo, specijalizirani metaboliti se mogu postupno stvarati kao odgovor na okolišni stres. Prema tome na specijalizirani metabolizam biljaka treba promatrati kao dio prilagodbe i preživljavanja na podražaje iz okoliša te također služi za uspostavljanje odnosa između biljaka i drugih organizama (Yang 2018).

Biljni specijalizirani spojevi obično se klasificiraju prema njihovim biosintetskim putevima. Tri glavne grupe specijaliziranih metabolita su fenoli, terpeni i steroidi te alkaloidi. Dobar primjer rasprostranjenih specijaliziranih metabolita su fenoli – molekule koje su uključene u sintezu lignina koji je zajednički svim višim biljkama, dok su drugi spojevi poput alkaloida slabo rasprostranjeni u biljnom carstvu i specifičniji za definirani rod i vrstu biljaka (Bourgaud i sur. 2001). Zbog svojih bioloških aktivnosti, specijalizirani biljni metaboliti stoljećima se koriste u tradicionalnoj medicini, a danas su bitni spojevi u industrijama poput farmaceutske i kozmetičke. U svakodnevnom životu koriste se kao lijekovi, arome, lijekovi za smirenje te esencijalna ulja (Kabera i sur. 2014).

1.7.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi vjerojatno čine najveću skupinu biljnih specijaliziranih metabolita, s više od 8000 fenolnih struktura koje su trenutno poznate (Dai i Mumper 2010). Karakterizirani su kao antioksidansi, imaju protuupalna i antikancerogena svojstva, te mogu zaštititi od oksidacijskog stresa (Kabera i sur. 2014). Zajednička karakteristika fenolnih spojeva je prisutnost jedne ili više hidroksilne skupine (Slika 6.) te se kreću od jednostavnih struktura s jednim aromatskim prstenom do vrlo složenih polimernih tvari (Hussein i El-Anssary 2018).



Slika 6. Osnovna kemijska struktura fenolnih spojeva (preuzeto od Reis Giada 2013).

Druga karakteristika ovih spojeva je da su obično vezani za druge molekule, poput šećera i proteina. Dok se u slobodnom obliku javljaju rijetko, vjerojatno zato što su otrovni kada se nalaze u slobodnom obliku, a vezanjem se barem djelomično detoksificiraju. Većina fenolnih spojeva polimerizira se u veće molekule poput proantocijanidina; kondenziranih tanina i lignana. Fenolna kiselina se može pojaviti kao ester ili glikozid konjugiran s drugim prirodnim spojevima kao što su flavonoidi, alkoholi, steroli i glukozidi (Kabera i sur. 2014). U prirodi se većina fenola pojavljuje kao glikozidi, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane za hidroksilne skupine. Pridruženi šećeri mogu biti prisutni kao monosaharidi, disaharidi ili čak kao oligosaharidi, a glukoza je najčešći pridruženi šećer (Bravo 1998).

Postoji nekoliko podjela fenolnih spojeva, ali prema svom ugljikovom lancu, fenolni spojevi mogu se podijeliti u nekoliko glavnih skupina (Reis Giada 2013). Najčešća podjela je ona prema Harbornu (1989) u kojoj se dijele prema broju atoma ugljika (Tablica 1).

Tablica 1. Podjela fenolnih spojeva prema broju ugljikovih atoma prema Harborne (1989) i Reis Giada (2013).

Skupina fenolnih spojeva	Osnovna struktura	Broj ugljikovih atoma	Primjer
Jednostavni fenoli; Benzokinoni	C ₆	6	Katehol, hidrokinon
Fenolne kiseline	C ₆ -C ₁	7	Galna i salicilna kiselina
Acetofenoni; Feniloctene kiseline	C ₆ -C ₂	8	Derivati cimetne kiseline
Hidroksicimetne kiseline; Fenilpropani; Kumarini	C ₆ -C ₃	9	Kavena i ferulinska kiselina, umbeliferon
Naftokinoni	C ₆ -C ₄	10	Juglon
Ksantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆	13	Mangiferin
Stilbeni; Antrakinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆	14	Resveratrol
Flavonoidi; Izoflavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆	15	Kvercetin, cijanidin, genistein
Lignani; Neolignani	(C ₆ -C ₃) ₂	18	Eusiderin
Biflavonoidi	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	30	Amentoflavon
Lignini	(C ₆ -C ₃) _n	n	Pinorezinol
Kondenzirani tanini	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	n	Prodelfinidin

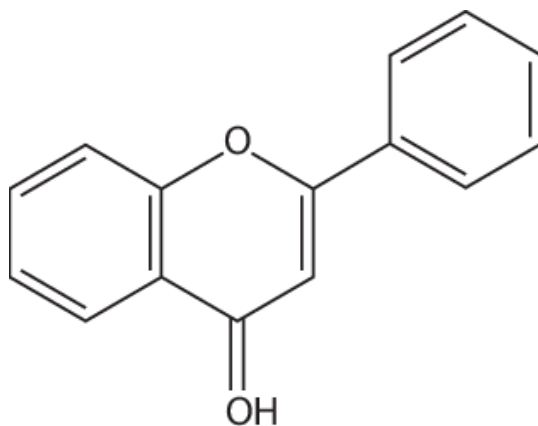
Fenoli se mogu klasificirati prema njihovoj strukturi ili biosintetskom podrijetlu. Mogu se sintetizirati kroz dva metabolička puta: putem šikiminske kiseline gdje se uglavnom stvaraju fenilpropanoidi i putem octene kiseline u kojem su glavni proizvodi jednostavni fenoli. Većina biljnih fenolnih spojeva sintetizira se kroz fenilpropanoidni put, dok kombinacijom oba puta stvara se najbrojnija skupina fenolnih spojeva u prirodi – flavonoidi (Reis Giada 2013).

Fenolne spojeve nalazimo u biljkama gdje doprinose njihovoj boji i okusu (gorčina i trpkost). Biljni fenoli uključeni su u obranu od ultraljubičastog zračenja ili agresije patogena i parazita (Dai i Mumper 2010). Dokazana su protuupalna, antialergijska i antikancerogena djelovanja zbog kojih su neki fenoli farmakološki cijenjeni. Tako primjerice kvercetin ima

protuupalnu aktivnost, a silibin antihepatotoksična svojstva. Drugi imaju fitoestrogenu aktivnost te su insekticidi, a mnoge molekule fenola također su i učinkoviti antioksidanti i sredstva za uklanjanje slobodnih radikala, posebno flavonoidi (Hussein i El-Anssary 2018). Fenolni spojevi sveprisutni su u svim biljnim organima i stoga su sastavni dio ljudske prehrane (voće, povrće, žitarice, mahunarke, kava, čaj, pivo itd.) Biljni fenoli uključuju fenolne kiseline, flavonoide, tanine i nešto rjeđe stilbene i lignane, a najzastupljeniji biljni fenoli u našoj prehrani su flavonoidi koji su još dodatno podijeljeni u šest podskupina. (Dai i Mumper 2010).

1.7.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najčešću i široko rasprostranjenu skupinu biljnih fenola te su rasprostranjeni po cijelom biljnom svijetu. Zajednička struktura flavonoida je difenilpropanoid ($C_6-C_3-C_6$) i sastoji se od dva aromatska prstena povezana kroz tri ugljika koji tvore oksigenirani heterocikl (Slika 7.) (Bravo 1998, Jiang i sur. 2016). Podijeljeni su u šest podgrupa: flavoni, flavonoli, izoflavoni i antocijani (Dai i Mumper 2010), i to prema stupnju oksidacije središnjeg prstena (Hussein i El-Anssary 2018).



Slika 7. Osnovna kemijska struktura flavonoida (preuzeto od

https://www.researchgate.net/figure/Basic-structural-backbone-of-flavonoids_fig2_283162468).

Svi flavonoidi potječu od aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina, a njihova struktura varira ovisno o stupnju i obrascu hidroksilacije, prenilacije, alkalizacije ili glikolizacije koje mijenjaju primarnu molekulu. Ove modifikacije mogu promijeniti topljivost flavonoida u vodi, a time se utječe i na njihovu bioraspoloživost (Gutiérrez-Grijalva i sur. 2018). Flavonoidi se u biljnim tkivima povremeno pojavljuju kao aglikoni, dok se općenito

nalaze kao glikozidi (Bravo 2009). Na različite položaje mogu vezati različite molekule šećera te zbog toga razlikujemo oko 10 000 flavonoida, od kojih su flavonoli najrašireniji (Cartea i sur. 2011 i Mageney i sur. 2017).

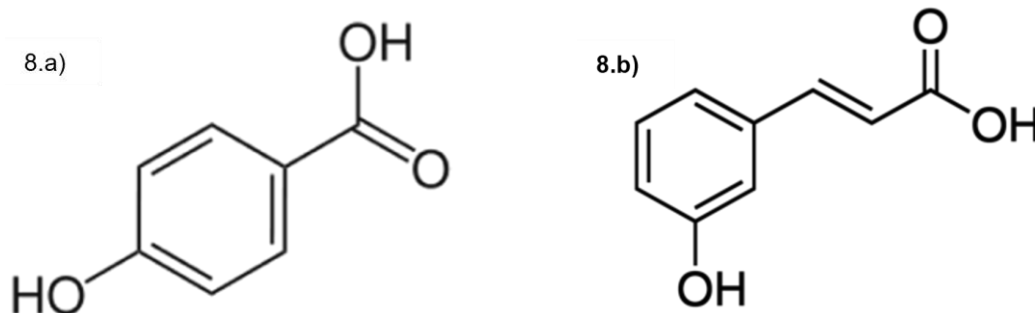
Flavonoidi su prisutni u visokim koncentracijama u epidermi lišća i plodova te su kao specijalizirani metaboliti uključeni u procese poput zaštite od UV zraka i oksidativni stres, pigmentacije i otpornosti na bolesti te zaštita od biljojeda. U procesu pigmentacije, antocijani su najvažnija skupina biljnih pigmenata te se široko koriste u prehrani zbog svojeg antioksidativnog djelovanja (Cartea i sur. 2011, Jiang i sur. 2016). Flavonoidi su poznati po svojim protuupalnim i antialergijskim učincima, te sadrže i antitrombotička i vazoprotektivna svojstva (Hussein i El-Anssary 2018). Važni su sastojci ljudske prehrane, najrasprostranjeniji su te najviše proučavani fenolni spojevi u biljnoj prehrani (Reis Giada 2013). Manipuliranjem ekspresijom flavonoida može se direktno utjecati na rast i razvoj biljaka, ali i mijenjati transport auksina u biljci. Podskupine flavonoida, izoflavoni i flavonoli su inhibitori transporta auksina. Oni utječu na visinu biljke, apikalnu dominaciju, broj cvjetova i razvoj korijena (Nix i sur. 2017).

1.7.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su kao i flavonoidi molekule karakteristične da imaju najmanje jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Gutiérrez-Grijalva i sur. 2018). Fenolne kiseline u prirodi nalazimo podijeljene u dvije grupe: derivati cimetine kiseline i derivati benzojeve kiseline. Derivati benzojeve kiseline imaju sedam atoma ugljika (C1-C6) i najjednostavnije su fenolne kiseline u prirodi. S druge strane, derivati cimetine kiseline imaju devet atoma ugljika (C3-C9), iako ih najčešće nalazimo u povrću sa sedam (Reis Giada 2013). U skupinu benzojevih kiselina pripadaju vanilinska kiselina, siringinska, salicilna, p-hidroksibenzojeva i galna kiselina, dok su među cimetnim kiselinama, u prirodi, najčešće p-kumarinska, ferulična, kavena i sinapinska kiselina. Fenolne kiseline sadrže benzenski prsten, jednu ili više hidroksilnih skupina te karboksilnu skupinu (Reis Giada 2013).

Fenolne kiseline nastaju iz puta šikimata koji uključuje nekoliko enzimskih koraka za pretvaranje međuprodukata pentoza fosfatnog puta i glikolize u tri ključne aminokiseline: fenilalanin, tirozin i triptofan. Dalje, fenilalanin i tirozin stvaraju dvije glavne skupine fenolnih kiselina – skupinu hidroksicimetnih kiselina (Slika 8.a) i skupinu hidroksibenzojevih

kiselina (Slika 8.b) (Taofiq i sur. 2017). Cimetne kiseline rijetko se nalaze slobodne u biljkama, općenito su u obliku estera s cikličkom alkoholnom kiselinom (Reis Giada 2013).



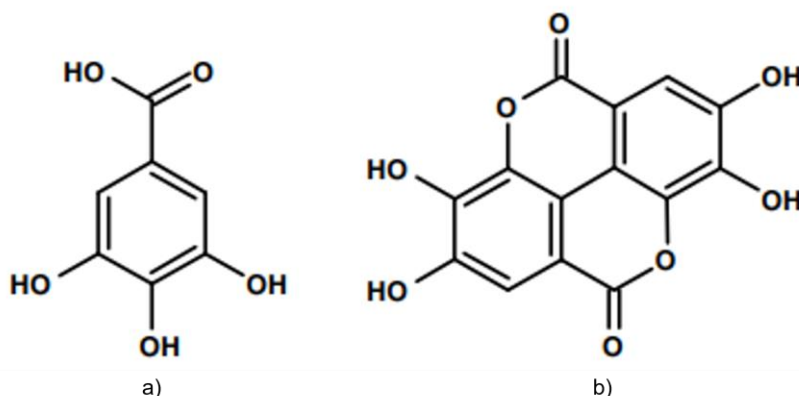
Slika 8.a i 8.b. Osnovna kemijska struktura a) hidroksibenzojevih i b) hidroksicimetnih kiselina (preuzeto od <https://fabricheminc.com/biochemicals-diagnostics-buffers/p-hydroxybenzoic-acid-phba/> i <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/h23007>).

Udio fenolnih kiselina u ljudskoj prehrani je oko jedne trećine fenolnih spojeva. Poznato je da fenolne kiseline i njihovi esteri imaju visoko antioksidativno djelovanje, posebice hidroksibenzojeva, hidroksicimetna, kavena i klorogenska kiselina, a ova aktivnost određena je brojem hidroksilnih skupina u molekuli, te su tako hidrokisilirane cimetne kiseline učinkovitije od benzojevih (Reis Giada 2013). S farmakološkog aspekta fenolnim kiselinama i njihovim derivatima pripisuje se prisutnost višestrukih hidroksilnih skupina u njihovoj kemijskoj strukturi te su zato pogodni za uklanjanje slobodnih radikala. Također, fenolne kiseline imaju protuupalno i antimikrobno djelovanje te je sve veći interes za njihovu uporabu u kozmetičkim proizvodima za njegu kože (Taofiq i sur. 2017).

1.7.1.3. Tanini

Važna, ali često zanemarena skupina polifenola su tanini. Tanini su fenolni spojevi koji imaju sposobnost taloženja proteina, točnije umrežavaju protein i čine ga otpornijim na bakterijske i gljivične napade, a definirali su ih Bate-Smith i Swain 1957. godine. Procjenjuje se da su tanini četvrti najzastupljeniji biokemijski proizvod koje producira provodno biljno

tkivo (Kraus i sur. 2003). Tanine klasificiramo u dvije glavne vrste tanina: kondenzirani tanini i tanini koji se mogu hidrolizirati. Veća pozornost pridaje se kondenziranim taninima, jer su u prirodi šire zastupljeni i važna su komponenta ljudske prehrane. Tanini koji se mogu hidrolizirati nastaju iz nekoliko molekula fenolnih kiselina, poput galne i heksahidroksidifene kiseline, te su one za središnju molekulu glukoze povezane esterskim vezama. Kada je glukoza esterificirana galnom kiselinom tada se tanini nazivaju galotanini, a kada je esterificirana dilakton heksahidroksidifenskom kiselinom odnosno elaginskom kiselinom tada se nazivaju elagitanini (Slika 9.). Velikoj raznolikosti u strukturi ovih spojeva doprinosi mogućnost stvaranja oksidativnih veza (Koleckar i sur. 2008., Hussein i El-Anssary 2018).



Slika 9. Osnovna kemijska struktura a) galne i b) elaginske kiseline (preuzeto od <https://ascelibrary.org/doi/epdf/10.1061/%28ASCE%29EE.1943-7870.0001196>).

S druge strane kondenzirani tanini su sastavljeni oligomeri ili polimeri flavan-3-ola. Nazivamo ih još i proantocijanidinima jer se u zagrijanoj otopini etanola razgrađuju na antocijanidine. (Koleckar i sur. 2008., Hussein i El-Anssary 2018). Strukturna raznolikost pojavljuje se zbog varijacije u uzorku hidoksilacije, strukture njihovih polimera, njihove interflavanske veze i stupnju polimerizacije. Proantocijanidini su prema obrascu hidoksilacije podijeljeni u nekoliko podskupina, međutim samo nekoliko njih se ističe u hrani i dodacima koje konzumiramo. Takvi primjeri uključuju pretvorbu (epi)katehina u cijanidin (procijanidini) i (epi)galokatehina u delfinidin (prodelfinidini) (Koleckar i sur. 2008, Beecher 2010).

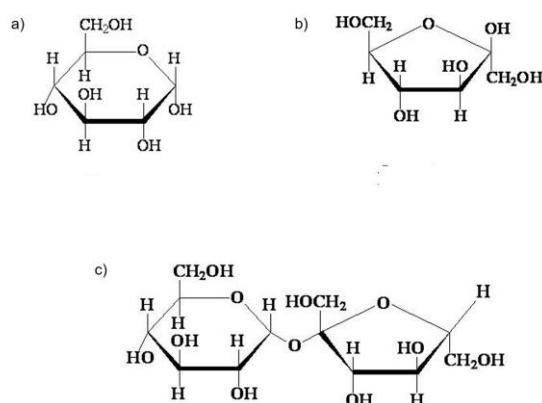
Tanini su prisutni u lišću, kori, plodovima i sjemenkama mnogih biljaka, a glavna funkcija im je zaštititi biljku od mikrobnih patogena, štetnih kukaca i drugih biljojeda (Furlan i sur. 2011). Također, tanini su prisutni u brojnim ekološkim procesima uz obranu biljojeda poput kruženja hranjivih tvari, mikrobnu aktivnost, stvaranje huminske kiseline,

kompleksiranje metala i pedogenezu. Prema tome, koncentracije tanina u biljkama variraju kao odgovor na promjene okoliša, kao što su hranjive tvari, svjetlost, temperatura CO₂, dostupnost vode i ozon (Kraus sur. 2003). Biljke biosintetiziraju galotanine, elagitanine ili kombinaciju obje vrste tanina koji se mogu hidrolizirati. Kondenzirani tanini prisutni su u mnogim vrstama viših biljaka, dok su hidrolizirani tanini ograničeni na Angiospermae, odnosno na kritosjemenjače – dvosupnice. Derivate galne kiseline sintetiziraju porodice poput Ericaceae, Geranieceae i Fagaceae, dok vrste podrazreda Dilleniidae i Rosidae sintetiziraju elagitanine (Koleckar i sur. 2008). Proantocijanidini su rašireni u cijelom biljnom carstvu, a sintetiziraju se fenilpropanoidnim i flavonoidnim putem, imaju raznoliku biološku ulogu poput zaštite od predatora (biljojeda), napada patogena (bakterija i gljivica) te ograničavanje rasta susjednih biljaka. Proantocijanidini važna su komponentna ljudske hrane. Tako, najveću skupinu procijanidine nalazimo u grejpu, jabukama, zrnu kakakovca, crnom vinu, zelenom čaju i čokoladi (Koleckar i sur. 2008, He i sur. 2008). Kao lijekovi tanini djeluju protiv dijareje te kao protuotrov kod trovanja teškim metalima i alkaloidima (Hussein i El-Anssary 2018). Posljednjih godina pozornost je privučena proantocijanidinima zbog njihovih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje poput imunomodulacijskog i antikancerogenog djelovanja, protuupalnog i antioksidativnog djelovanja, UV- zaštitne funkcije itd. (He i sur. 2008).

1.8. Šećeri

Biljke su fotosintetski i autotrofni organizmi koji proizvode i konzumiraju šećere (Rosa i sur. 2009). Topivi šećeri su osjetljivi na okolišne stresove koji utječu na opskrbu ugljikohidrata. Univerzalna su komponenta većine živih organizama i temeljna građevna jedinica u biosintetskim procesima (Maness 2010). Sintetiziraju se iz ugljikovog dioksida (CO₂) tijekom reakcija u tami u procesu fotosinteze i koriste se kao prekursori za brojne spojeve koji su potrebni za održavanje biljaka, i kao signalne molekule tijekom stresa (Maness 2010). Topivi šećeri ne funkcioniraju samo kao metabolički resursi i strukturne komponente, oni također djeluju kao signali koji reguliraju procese koji uključuju biljni rast i razvoj. Djeluju direktno kao negativni signali ili kao modulatori osjetljivosti biljaka te imaju ulogu u odgovoru stanica na stres. Promjene u količini i obliku topivih ugljikohidrata često su povezane sa stresom biljaka, mogu biti posljedica povećane ili smanjene biosinteze šećera,

pretvaranja škroba ili drugih oblika skladištenja u topive šećere i promjena brzine prijenosa šećera (Maness 2010). Neke transgene biljke akumuliraju šećerne alkohole za koje se smatra da povećavaju osmotski potencijal stanice i povećavaju otpornost na stres (Abebe i sur. 2003). Također je poznato da biljke osmotsku ravnotežu održavaju nakupljanjem slobodnih aminokiselina, prolina i šećera u korijenu i izdancima (Mohammadkhanni i Heidari 2008). U životnom ciklusu biljaka, klijanje sjemena i rani rast klijanaca ovise o skladišnim tvarima poput ugljikohidrata koji se pojavljuju u obliku topivih šećera (saharoza, glukoza i fruktoza (Slika 10.)) (Rosa i sur. 2009).



Slika 10. Kemijska struktura a) glukoze, b) fruktoze i c) saharoze (preuzeto i prilagođeno od <https://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>).

Saharoza, glukoza i fruktoza imaju središnju ulogu u strukturi i metabolizmu biljaka na staničnoj i na razini cijeloga organizma. Topivi šećeri uključeni su u reakcije odgovora na stres, ali djeluju i kao hranjive tvari te kao signalne molekule koje aktiviraju specifične reakcije čiji je rezultat modifikacija ekspresije gena i proteomskih obrazaca (Couée i sur. 2006).

Proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) povećava se u uvjetima kao što su ultraljubičasto svjetlo, okolišni stres ili djelovanjem herbicida. U biljkama su posebno izražene veze između proizvodnje ROS-ova i fotosintetskog metabolizma. Topivi šećeri mogu biti uključeni u metaboličke puteve koji proizvode ROS, a isto tako uključeni su u metaboličke puteve koji proizvode NADPH poput oksidativnog pentoza-fosfat puta koji doprinosi uklanjanju reaktivnih kisikovih vrsta (Couée i sur. 2006).

1.9. Fotosintetski pigmenti

Obojani biljni spojevi općenito se nazivaju „pigmentima“. Biljke proizvode više od 200 000 različitih spojeva, uključujući i one pigmentirane. Ljudi prepoznaju boju spoja prema apsorpciji svjetla u rasponu valnih duljina između 380 i 730 nm, dok insekti prepoznaju svjetlo kraće valne duljine (Tanaka i sur. 2008). Pigmenti se prema podrijetlu mogu klasificirati kao prirodni, sintetski ili anorganski. Prirodne pigmente proizvode živi organizmi poput biljaka, životinja, gljiva i mikroorganizama, a sintetski pigmenti su dobiveni u laboratoriju. Prirodni i sintetski pigmenti su organski spojevi, a anorganski pigmenti se mogu naći u prirodi ili reproducirati sintezom (Delgado-Vargas i sur. 2000).

Flavonoidi, skupina specijaliziranih metabolita imaju najširi raspon boja, od blijedožute do plave. Konkretno, antocijani su odgovorni za boje od narančaste do plave koje se nalaze u mnogim cvjetovima, listovima, plodovima, sjemenkama i drugim tkivima. Betalaini, žuto do crveni spojevi, topljivi su u vodi i pohranjeni u vakuolama, a karotenoidi su sveprisutni pigmenti u biljkama i mikroorganizmima. Bitne su komponente fotosustava i daju žuto-crvenu boju cvijeću i voću (Tanaka i sur. 2008).

Osim njihove uloge u bojanju, pigmenti obavljaju i važne biološke funkcije. Biljni pigmenti su važni u signalizaciji, privlače oprašivače i raspršivače te odbijaju biljojede, a otkriveno je da imaju i pozitivnu ulogu u ljudskom zdravlju (Eldahshan i sur. 2013).

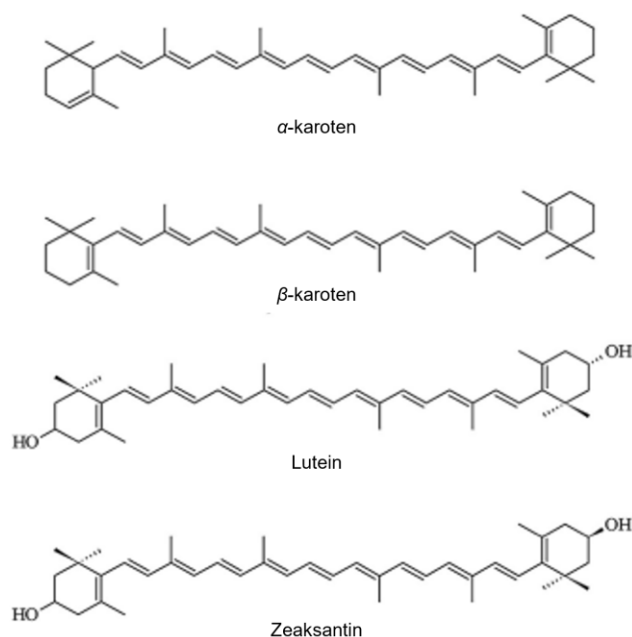
1.9.1. Karotenoidi i porfirini

Karotenoidi su najrasprostranjenija skupina pigmenata. To su crveni, narančasti i žuti pigmenti topivi u lipidima, a nalaze se u membranama kloroplasta i kromoplasta. Identificirani su u fotosintetskim i nefotosintetskim organizmima, a odgovorni su za crvene, narančaste i žute boje voća, povrća, gljiva, cvijeća, kao i ptica, insekata i rakova. Nalaze se uglavnom u biljkama, algama i fotosintetskim bakterijama, gdje imaju ulogu u procesu fotosinteze. Javljaju se i u nekim nefotosintetskim bakterijama, kvascima i plijesnima gdje obavljaju zaštitnu funkciju od oštećenja uzrokovanih svjetlom i kisikom (Delgado-Vargas i sur. 2000, Eldahshan i sur. 2013).

Karotenoidi su sastavljeni spojevi od osam izoprenoidnih jedinica te se smatraju derivatima likopena, ovisno o reakcijama kojima nastaju: hidrogenacijom, dehidrogenacijom,

ciklizacijom, umetanjem kisika, migracijom dvostruke veze, migracijom metilne skupine, produljenjem lanca ili skraćivanjem lanca (Delgado-Vargas i sur. 2000).

Prema kemijskoj strukturi karotenoidi (Slika 11.) se klasificiraju kao karoteni koji se sastoje od ugljika i vodika, i kao oksikarotenoidi ili ksantofili koji imaju ugljik, vodik i dodatno kisik. Također dijele se na primarne i sekundarne karotenoide. Primarna skupina karotenoida potrebna je biljkama u fotosintezi (β -karoten, violaksantin i neoksantin), dok sekundarne karotenoide pronalazimo u voću i cvijeću (α -karoten, β -kriptoksantin, zeaksantin, anteraksantin, kapsantin, kapsorubin) (Delgado-Vargas i sur. 2000).



Slika 11. Strukture glavnih predstavnika karotenoida (preuzeto i prilagođeno od <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444639325000061>).

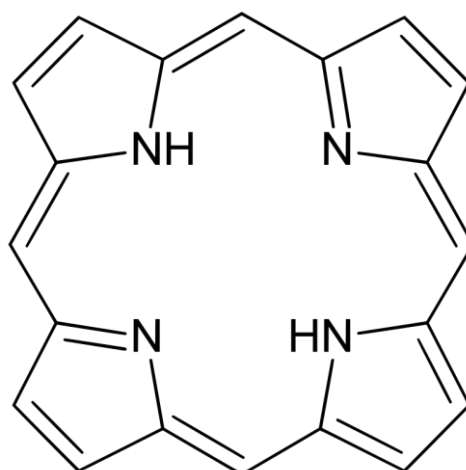
Karotenoidi se nakupljaju u kloroplastima svih zelenih biljaka kao mješavina α - i β -karotena, β -kriptoksantina, luteina, zeaksantina, violaksantina i neoksanina. Postoje kao kompleksi povezani nekovalentnim vezama s proteinima. U zelenom lišću sastav karotenoida ovisi o biljci i uvjetima razvoja, a pronalazimo ih slobodne i neesterificirane. Njihovu boju prikriva klorofil, ali u kasnijim fazama razvoja biljke ti pigmenti se ističu jer doprinose jarkim bojama mnogih cvjetova i voća (Delgado-Vargas i sur. 2000, Bartley i Scolnik 1995).

Karotenoidi su neophodni za biljni svijet. Pružaju važnu fotozaštitu tijekom fotosinteze, neki služe kao prekursori za biosintezu fitohormona abscizinske kiseline (ABA-fitohormon koji modulira razvoj i stresni proces) te imaju ulogu u privlačenju oprašivača (Eldahshan i sur. 2013). Što se tiče ljudi, od preko 600 identificiranih karotenoida u prirodi, njih oko 40 je

prisutno u čovjekovoj prehrani. Od tih 40 samo je 14 pronađeno u krvi i tkivu čovjeka (Eldahshan i sur. 2013).

Porfirini su makrociklički pigmenti i kofaktori u prirodi. Ističu se kao enzimski kofaktori, fotoaktivne boje ili kao signalne tvari. Njihovo sudjelovanje u stvaranju, skladištenju i korištenju kisika ključno je za život, dok su njihova fotokemijska svojstva ključna za biokemijsko funkcioniranje biljaka (Senge i sur. 2021). Igraju mnoge ključne uloge u prirodi od prijenosa kisika elektrona do metanogeneze i fotosinteze, a u fiziologiji biljaka funkcioniraju kao reakcijski centar i pomoćni pigmenti u fotosintezi (Senge i sur. 2021).

Porfirini se sintetiziraju iz glutamata razgranatim biosintetskim putem koji se odvija u plastidima. Krajnji produkti ovog razgranatog puta su sirohem, hem, fitokromobilin, klorofil *a* i klorofil *b* (Larkin 2016). Porfirini imaju makrocikličku strukturu (Slika 12.) koju čine četiri pirolska aromatska prstena povezana metinskim jedinicama. Atomi dušika u unutrašnjosti tvore središnji džep idealno postavljen za čvrsto povezivanje metalnih atoma na tetradentski način (u biološkim sustavima prevladavaju Fe, Co ili Mg) (Auwärter i sur. 2015).



Slika 12. Kemijska struktura porfirina (preuzeto od <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Porphyrin>).

1.10. Slobodni radikali i antioksidansi

Kisik, nezamjenjiv element za život u određenim situacijama ima štetne učinke na ljudsko tijelo. Štetni učinci kisika nastaju zbog stvaranja i djelovanja kemijskih spojeva, poznatih kao reaktivne kisikove vrste (ROS) (Lobo i sur. 2010). Slobodni radikali su vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci koji reagiraju s drugom

molekulom uzimanjem ili davanjem elektrona, te se ponašaju kao reducensi ili oksidansi. Mnogi su radikali nestabilni i visoko reaktivni te njihovim nakupljanjem može doći do oštećenja stanica, tkiva i pojave bolesti. Prirodni antioksidansi u biljkama uklanjaju štetne slobodne radikale iz našeg tijela. Antioksidansi igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju i sudjeluju u borbi protiv kardiovaskularnih poremećaja, oštećenja pluća i upala te štite ljudski organizam od bolesti uzrokovanih slobodnim radikalima (Bhalodia i sur. 2013).

Najčešće reaktivne kisikove vrste uključuju superoksidni anion (O_2^-), hidrogen peroksid (H_2O_2), peroksil radikale (ROO^\cdot), hidroksil (OH^\cdot), dušikov oksid (NO), peroksinitrit anion (ONO). Slobodni radikali u aerobnom metabolizmu uključeni su u niz regulacijskih procesa kao što su stanična proliferacija, apoptoza i ekspresija gena. Ako se nakupi višak slobodnih radikala može doći ukidanja obrambene sposobnosti antioksidativnog sustava. ROS napadaju i izazivaju oksidativno oštećenje raznih biomolekula poput proteina, lipida, lipoproteina i DNA. Oksidativni stres dovodi do pojave citotoksičnih spojeva i mijenjanja ravnoteže oksidansa i antioksidansa (redoks homeostaza) koja je odgovorna za normalno funkcioniranje stanica (Bhalodia i sur. 2013, Pisoschi i sur. 2016).

Antioksidansi su molekule koje mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju drugih molekula. Reaktivne kisikove vrste detoksificiraju se pomoću antioksidansa. Antioksidansi su molekule koje doniraju elektrone na slobodne radikale i time ih neutraliziraju i smanjuju njihovu sposobnost oštećenja. Djeluju kao hvatači radikala, donori vodika, donori elektrona, razlagači peroksida, gasitelji singletnog kisika i inhibitori enzima (Bhalodia i sur. 2013, Lobo i sur. 2010). Prirodni antioksidansi mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni antioksidansi mogu biti neenzimatski (glutation, bilirubin, melatonin, albumin) i enzimatski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza). Izvor egzogenih antioksidanasa predstavljaju prehrambeni proizvodi, lijekovi i dodaci prehrani. Važni su u suzbijanju slobodnih radikala kada endogeni antioksidansi ne mogu osigurati zaštitu. Ezgozeni antioksidansi su karotenoidi, tokoferoli, vitamin D, fenolne kiseline, askorbinska kiselina (Pisoschi i sur. 2016).

1.11. Cilj rada

Cilj ovog rada je usporediti kvalitativni i kvantitativni sastav različitih skupina bioaktivnih spojeva (totalni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, proantocijanidini, topivi šećeri, karotenoidi i porfirini), te antioksidacijski potencijal različitim

metodama (ABTS, FRAP i DPPH) etanolnih ekstrakata latica i tepala cvjetnica iz različitih biljnih porodica: šafrana (*Crocus heuffelianus* Herb., Iridaceae), šumskog sljeza (*Malva sylvestris* L., Malvaceae), pravog duhana (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), suncokreta (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) i ljekovitog nevena (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) kako bi se doprinijelo boljem razumijevanju biopotencijala ovog biljnog materijala. Sve spomenute vrste nezahtjevne su za uzgoj, većina njih je samoniklo, a neke se mogu pronaći u tradicionalnim vrtovima Hrvatske u kojima se najčešće sade iz hortikulturnog aspekta, te bi ih se, ukoliko to rezultati potvrde, potencijalno moglo intenzivnije iskorištavati u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

Kao modelni organizmi za istraživanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog kapaciteta korištene su vrste: šafran (*Crocus heuffelianus* Herb., Iridaceae), šumski sljez (*Malva sylvestris* L., Malvaceae), pravi duhan (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), jednogodišnji suncokret (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) i ljekoviti neven (*Calendula officinalis* L., Asteraceae). Sakupljanje cvjetova navedenih vrsta provedeno je u vrijeme cvatnje, dakle u srpnju 2020. godine za sve vrste osim šafrana čije su latice sakupljene u ožujku 2020. godine. Cvjetovi suncokreta, nevena i šumskog sljeza sakupljeni su na području grada Đurđevca, duhan je sakupljen na području Pitomače, a šafran u Botaničkom vrtu Biološkog odsjeka PMF-a, Sveučilišta u Zagrebu (Slika 13.). Sa sakupljenih cvjetova odvojene su latice i tepala koji su osušeni u mraku na prozračnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon sušenja latice i tepala su mehanički usitnjeni (Slika 14.) i spremljeni u mrak pri sobnoj temperaturi.



Slika 13. Područja sakupljanja cvjetova na karti Republike Hrvatske



Slika 14. Osušeni biljni materijal: a) ljekoviti neven, b) šafran, c) pravi duhan, d) šumski sljez, e) jednogodišnji suncokret

2.2. Metode

2.2.1. Priprema ekstrakata

Na analitičkoj vagi izvagala sam 20 mg suhog tkiva latica i tepala i zatim dodala otapalo do volumena od 1 mL. Kao otapalo koristila sam 40%-tni etanol (EtOH), 70%-tni etanol (EtOH), 80%-tni aceton, 100mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0) te deioniziranu vodu, ovisno o metodi analize. Uzorke sam inkubirala 60 minuta pri sobnoj temperaturi na vrtložnoj mješalici pri 20 okretaja u minuti, a potom centrifugirala na sobnoj temperaturi 5 minuta pri 10 000 rpm u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R. Supernatante sam odvojila u čiste epruvete i spremila na -20°C do daljnjih analiza.

2.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola koristila sam 40%-tne i 70%-tne etanolne ekstrakte koncentracije 15 mg/mL (koje sam pripremila razrjeđivanjem izvornih ekstrakata koncentracije 20 mg/mL). Koristila sam metodu s Folin-Ciocalteu reagensom prema Zhishen i sur. (1999). Metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji predstavlja smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u plavo obojeni volframov-oksidi i molibdenov-oksidi (Ough i Amerine 1998). Sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima određen je spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm. Prvo sam u epruvetu ispipetirala 790 μ L deionizirane vode (dH_2O), zatim 10 μ L 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta latica i tepala šafrana, duhana, sljeza, nevena i suncokreta koncentracije 15 mg/mL. Na kraju sam dodala 50 μ L Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. Dobivenu otopinu promiješala sam na vorteksu, a nakon miješanja dodala 150 μ L 1,88 M otopine Na_2CO_3 i ponovno promiješala. Na kraju sam otopine inkubirala 30 minuta na 45°C. Po 200 μ L svake otopine ispipetirala sam na mikrotitarsku pločicu u tetraplikatu. Kao kontrolu sam umjesto ekstrakta koristila 40%-tni i 70%-tni etanol. Apsorbanciju sam očitavala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 734 nm.

Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim uzorcima određen je očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline i kvercetina različitih koncentracija (0,1 – 1 mg/mL) pri 734 nm. Baždarni dijagram za određivanje sadržaja ukupnih fenola, kao ekvivalenata galne kiseline i kvercetina, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 734 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline i kvercetina. Sadržaj ukupnih

fenola izražen je u miligramima ekvivalenta galne kiseline i kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg EGK/g SM; mg QE/g SM).

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu: $y = 0,546x + 0,1099$; $R^2 = 0,9973$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – masena koncentracija galne kiseline

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 0,7429x + 0,0858$; $R^2 = 0,9973$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – masena koncentracija kvercetina

2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Koncentraciju ukupnih flavonoida u 40%-tnim i 70%-tnim etanolnim ekstraktima odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem nastalog intenziteta obojenja koje ovisi o količini prisutnih flavonoida pri valnoj duljini 510 nm, prema metodi Zhishen i sur. (1999). Koristila sam ekstrakte koncentracije 20 mg/mL. Određivanje sadržaja flavonoida temelji se na sposobnosti flavonoida da tvore kompleks s aluminijevim kloridom (AlCl_3).

U epruvetu sam ispipetirala 280 μL dH_2O , 70 μL etanolnog ekstrakta i 21 μL 5%-tne vodene otopine NaNO_2 . Dobivenu otopinu sam promiješala na vorteksu i inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodala sam 21 μL 10%-tne vodene otopine AlCl_3 , te ponovno promiješala i inkubirala 6 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodala sam 140 μL 1M NaOH i 168 μL dH_2O . Smjesu sam još jednom promiješala na vorteksu i volumen od 200 μL svake otopine ispipetirala na mikrotitarsku pločicu u tetraplikatu. Kao kontrolu sam umjesto ekstrakta koristila 40%-tni i 70%-tni etanol. Apsorbanciju sam očitavala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 510 nm.

Sadržaj ukupnih flavonoida u pojedinim uzorcima odredila sam očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina kvercetina različitih koncentracija (0,1 – 1 mg/mL) pri 510 nm. Baždarni dijagram za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida, kao ekvivalenta kvercetina, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 510 nm o masenoj koncentraciji kvercetina. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM).

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 0,3268x + 0,0428$; $R^2 = 0,99$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 510 nm

x – masena koncentracija kvercetina

2.2.4. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli

Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli izmjereni su na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c modificiranom metodom prema Howard i sur. (2003). U epruvetu sam dodala 25 μ L 5 puta razrijeđenog 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta početne koncentracije 20 mg/mL, 25 μ L otopine klorovodične kiseline (HCl) masene koncentracije 1 g/L razrijeđene u 96%-tnom etanolu i 455 μ L vodene otopine HCl masene koncentracije 2 g/L. Otopine sam 5 sekundi miješala na vorteksu, nakon čega sam 500 μ L otopine ispipetirala u staklene kivete. Ukupne hidroksicimetne kiseline mjerila sam na valnoj duljini 320 nm, a ukupne flavonole na 360 nm.

Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina u pojedinim uzorcima odredila sam očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancija otopina cimetne kiseline u 96%-tnom etanolu različitih koncentracija (0,005 - 0,1 mg/mL) pri 320 nm, odnosno sadržaj ukupnih flavonola odredila sam baždarnim pravcem dobivenim mjerenjem apsorbancija otopina kvercetina u 96%-tnom etanolu različitih koncentracija (0,02 – 0,1 mg/mL) pri 360 nm.

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražena je kao miligram ekvivalenata cimetne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ECK/g SM), dok je sadržaj flavonola izražen u miligramu ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM).

Jednadžba baždarnog pravca za cimetnu kiselinu: $y = 0,3025x + 0,024$; $R^2 = 0,9748$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 320 nm

x – masena koncentracija cimetne kiseline

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 3,13x + 0,028$; $R^2 = 0,9959$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 360 nm

x – masena koncentracija kvercetina

2.2.5. Proantocijanidini

Za određivanje ukupnih proantocijanidina koristila sam metodu prema Weidner i sur. (2009). Otopine sam pripremila na sljedeći način: 420 μL 4%-tne vodene otopine vanilina, 210 μL koncentrirane HCl i 70 μL 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta. Otopine sam promiješala na vorteksu i inkubirala 15 min u mraku na sobnoj temperaturi, a zatim, u triplicatu, ispipetirala po 200 μL otopine u mikrotitarske pločice. Za kontrolu nisam koristila ekstrakte nego 40%-tni i 70%-tni etanol. Apsorbanciju sam izmjerila na spektrofotometru FLUOstar Optima na 520 nm. Kao standard je korištena otopina catechina različitih koncentracija (0,01 - 0,1 mg/mL) pripremljena istim postupkom. Koncentraciju proantocijanidina odredila sam pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije otopina catechina. Baždarni pravac za određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina, kao ekvivalenta catechina, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 520 nm o masenoj koncentraciji catechina. Sadržaj ukupnih proantocijanidina izražen je u miligramima ekvivalenta catechina po gramu suhe mase uzorka (mg ECAT/g SM).

Jednadžba baždarnog pravca za catechin: $y = 0,3902x + 0,0875$; $R^2 = 0,991$ pri čemu je:

y – apsorbancija pri 520 nm

x – masena koncentracija otopine catechina

2.2.6. Topivi šećeri

Za određivanje koncentracije šećera u uzorcima koristila sam metodu prema Dubois i sur. (1956). Ova metoda je jednostavna, brza i pouzdana te se koristi za mjerenje koncentracije šećera (jednostavnih šećera, oligosaharida, polisaharida) i njihovih derivata (uključujući i metil etere sa slobodnim reducirajućim grupama) u reakciji s fenolom i koncentriranom sumpornom kiselinom dajući narančasto-žutu boju.

Volumen od 250 μL 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta koncentracije 0,5 mg/mL ispipetirala sam u epruvetu, zajedno sa 125 μL 5%-tnog fenola i 625 μL koncentrirane sumporne kiseline (H_2SO_4). Sve sam promiješala na Vortex vrtložnoj mješalici, inkubirala 10 minuta pri sobnoj temperaturi, ponovno promiješala te stavila u termostatiranu tresilicu

inkubirati 15 minuta pri 30°C. Apsorbanciju sam izmjerila spektrofotometrom FLUOstar Optima na 485 nm. Sadržaj topivih šećera određen je pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancija otopina saharoze različitih koncentracija (0,01– 0,5 mg/mL). Sadržaj topivih šećera izražen je u miligramima ekvivalenta saharoze po gramu suhe mase uzorka (mg ESAH/g SM).

Jednadžba baždarnog pravca za saharozu: $y = 4,0093x + 0,033$; $R^2 = 0,9999$ pri čemu je:

y – apsorbancija pri 485 nm

x – masena koncentracija otopine saharoze

2.2.7. Karotenoidi i porfirini

Metodu određivanja karotenoida provela sam prema radu Sumanta i sur. (2014). Koristila sam ekstrakte koncentracije 20 mg/mL u 80%-tnom acetonu. Nakon što sam smjesu promiješala na vrtložnoj mješalici i centrifugirala na sobnoj temperaturi 5 minuta pri 6000 rpm, odvojila sam supernatant. Talog sam još dva puta ekstrahirala 80%-tnim acetonom, a talog ekstrakta nevena i suncokreta tri puta (dok talog nije postao potpuno bijel). Apsorbancije sam izmjerila na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c pri 470, 647 i 663 nm.

Koncentraciju karotenoida i porfirina odredila sam korištenjem sljedećih formula:

$$\text{Chl } a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$\text{Chl } b = 21,5 A_{647} - 5,1 A_{663}$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

Porfirini

$$= \frac{(12,25 \cdot A_{663}) - (2,55 \cdot A_{647})}{892} + \frac{(20,31 \cdot A_{647}) - (4,91 \cdot A_{663})}{906} + [(196,25 \cdot A_{575}) - (46,6 \cdot A_{590}) - (58,68 \cdot A_{628})] + [(61,81 \cdot A_{590}) - (23,77 \cdot A_{575}) - (3,55 \cdot A_{628})] + [(42,59 \cdot A_{628}) - (34,32 \cdot A_{575}) - (7,25 \cdot A_{590})]$$

pri čemu je:

A = apsorbancija (pri odgovarajućoj valnoj duljini)

C_a = koncentracija Chl a

C_b = koncentracija Chl b

2.2.8. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je metoda primjenjiva za procjenu lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa uključujući fenole, hidroksicinamate, karotenoide i plazmatske antioksidanse. Metoda ABTS se u literaturi naziva i TEAC metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Koristi se plavo-zeleni ABTS⁺ radikal-kation koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom molekule ABTS pomoću otopine kalijevog peroksodisulfata. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog radikala ABTS⁺, što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti i koncentraciji ispitivanog antioksidansa te trajanju reakcije. Smanjenjem apsorbancije radikala ABTS⁺ mjeri se udjel reduciranog radikala ABTS⁺ kojeg gase antioksidansi, a antioksidacijska aktivnost izražava se kao postotak inhibicije radikala ABTS⁺ (Re i sur. 1999).

Na mikrotitarsku pločicu u triplikatu sam ispipetirala 10 µL 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta i 1 mL ABTS⁺. Kod kontrole umjesto ekstrakta koristila sam 40%-tni i 70%-tni etanol. Otopine sam inkubirala 6 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Prije mjerenja na spektrofotometru FLUOstar Optima provjerena je i podešena apsorbancija radikala ABTS⁺ na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c dodavanjem ABTS reagensa ili razrjeđivanjem 96%-tnim etanolom, tako da apsorbancija iznosi $0,7 \pm 0,02$. Apsorbancije uzoraka izmjerene su na 734 nm, a postotak inhibicije radikala ABTS⁺ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

pri čemu je:

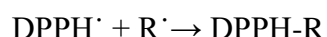
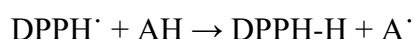
A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka

2.2.9. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

Metoda DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) je brza i jednostavna, pa tako i jedna od najčešće korištenih metoda kojom se određuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala. DPPH[•] (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni slobodni radikal jer se slobodni elektroni u molekuli delokaliziraju na cijelu molekulu što dovodi do njegove veće stabilnosti. Metoda

se zasniva redukciji alkoholne otopine radikala DPPH u prisutnosti antioksidansa (AH) ili radikala (R) pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). Zbog svojeg nesparenog elektrona radikal DPPH intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. Reakcijom s antioksidansom dolazi do promjene ljubičaste boje otopine u žutu i smanjenja apsorbancije. Antioksidacijska aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH-radikala koje je posljedica njegove redukcije. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH koristila sam protokol prema Radić Brkanac i sur. (2015).



U epruvetu sam ispipetirala 665 μL 0,1 mM DPPH $^{\cdot}$ u 96%-tnom etanolu i 35 μL 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta, a zatim sam otopinu promiješala na vrtložnoj miješalici te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije smjese, otopinu sam prenijela na mikrotitarsku pločicu (svaku otopinu sam prenijela u triplikatu). Kod kontrole umjesto ekstrakta koristila sam 40%-tni i 70%-tni etanol. Smjese sam također inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije apsorbanciju sam očitala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 517 nm. Reakciju uklanjanja slobodnog radikala prati promjena boje od intenzivno ljubičaste na početku reakcije do žute, a što se detektira smanjenjem apsorbancije na navedenoj valnoj duljini. Postotak inhibicije radikala DPPH $^{\cdot}$ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

pri čemu je:

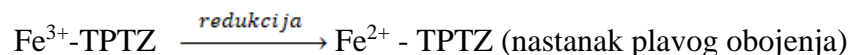
A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka

2.2.10. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

FRAP (eng. *Ferric reducing/Antioxidant power*) je jednostavni direktni test antioksidacijskog kapaciteta u kojem se antioksidacijsku aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. Neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C i bioflavonoidi) mogu se smatrati reducensima koji

uzrokuju redukciju oksidansa. U metodi FRAP oksidans se reducira pomoću reducensa u redoks kolometrijskoj reakciji. Reakcija se odvija pri niskim pH uvjetima. Iz žuto obojenog kompleksa Fe^{3+} - TPTZ ioni Fe^{3+} se reduciraju u intenzivno plavi kompleks Fe^{2+} - TPTZ pri valnoj duljini od 593 nm (Benzie i Strain, 1999).



Prvo sam pripremila svježi FRAP reagens miješanjem 50 mL 300 mM acetatnog pufera, 5 mL 10 mM otopine TPTZ u 40mM kloridnoj kiselini i 5 mL 20 mM FeCl_3 u omjeru 10:1:1. Na mikrotitarsku pločicu ispipetirala sam 950 μL reagensa FRAP i 50 μL 40 %-tnog i 70 %-tnog etanola kao kontrolu, te 950 μL reagensa FRAP i 50 μL 15 mg/ml 40%-tnog i 70%-tnog etanolnog ekstrakta. Svaku reakciju sam ponovila 3 puta. Otopine sam ostavila na sobnoj temperaturi 4 minute. Nakon inkubacije izmjerila sam apsorbanciju na valnoj duljini od 593 nm. Postotak redukcije kompleksa Fe^{3+} -TPTZ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} * 100$$

pri čemu je:

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka

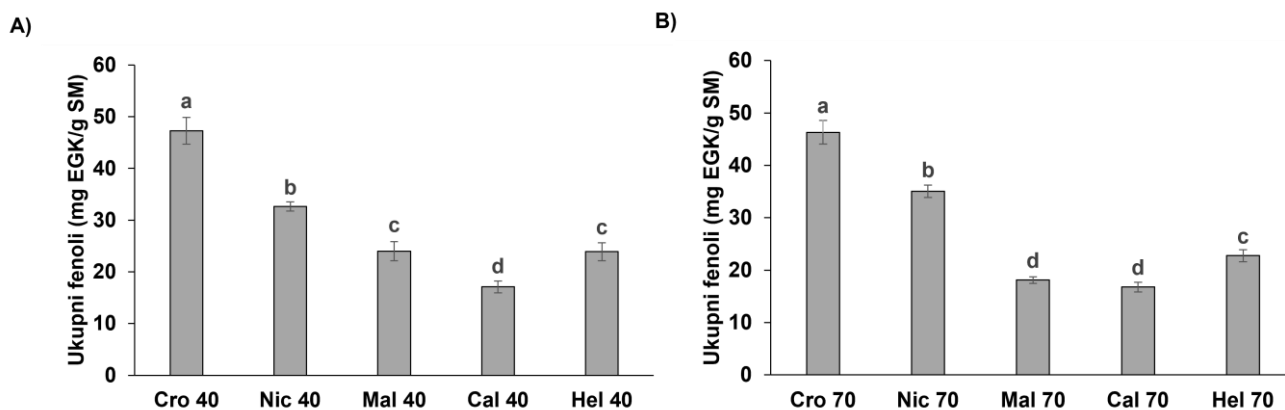
2.2.11. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci statistički su obrađeni u programu Statistica 13.1 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedba uzoraka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom testa "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Ukupni fenoli

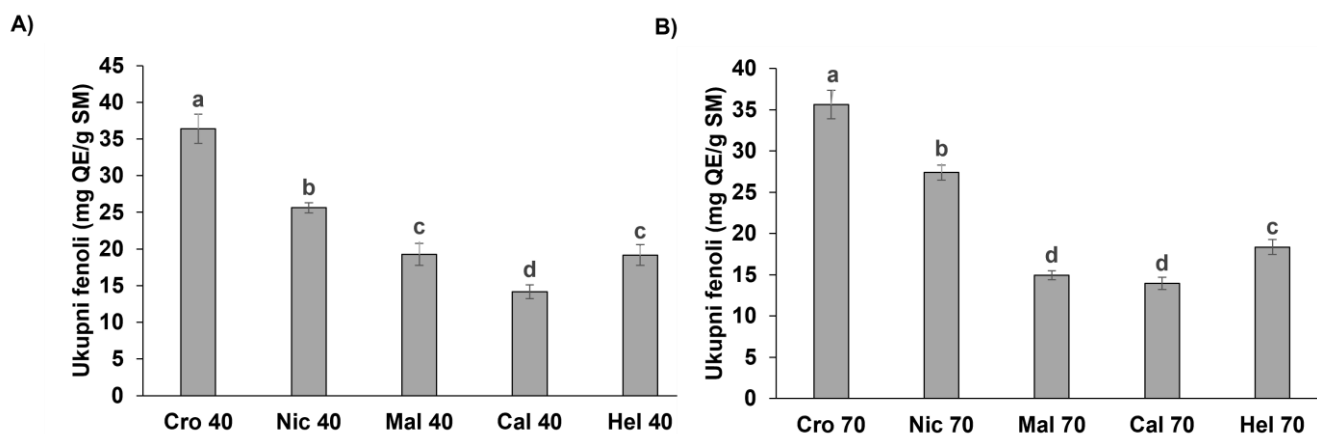
Rezultati na Slici 15. prikazuju koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima različitih cvjetnica u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izraženih u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EGK/g SM). Najveći udio zabilježen je u etanolnim ekstraktima šafrana ($47,30 \pm 2,58$ mg EGK/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $46,29 \pm 2,25$ mg EGK/g SM u 70%-tnom etanolu), a najmanji u nevenu ($17,08 \pm 1,14$ mg EGK/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $16,77 \pm 0,90$ mg EGK/g SM u 70%-tnom etanolu). 40%-tni etanolni ekstrakti šafrana i duhana bilježe statistički veće koncentracije ukupnih fenola od 40%-tnih etanolnih ekstrakata sljeza i suncokreta, dok ekstrakt nevena bilježi statistički značajno manje koncentracije fenola od svih drugih ekstrakata. 70%-tni etanolni ekstrakti šafrana, duhana i suncokreta bilježe statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenola od 70%-tnih etanolnih ekstrakata sljeza i nevena.



Slika 15. Udio ukupnih fenola ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EGK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

Rezultati na Slici 16. prikazuju koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima različitih cvjetnica u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izraženih u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM). Najveći udio zabilježen je u etanolnim ekstraktima šafrana ($36,39 \pm 1,99$ mg QE/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $35,64 \pm 1,73$ mg QE/g SM u 70%-tnom etanolu), a najmanji u biljkama nevena ($14,18 \pm 0,94$

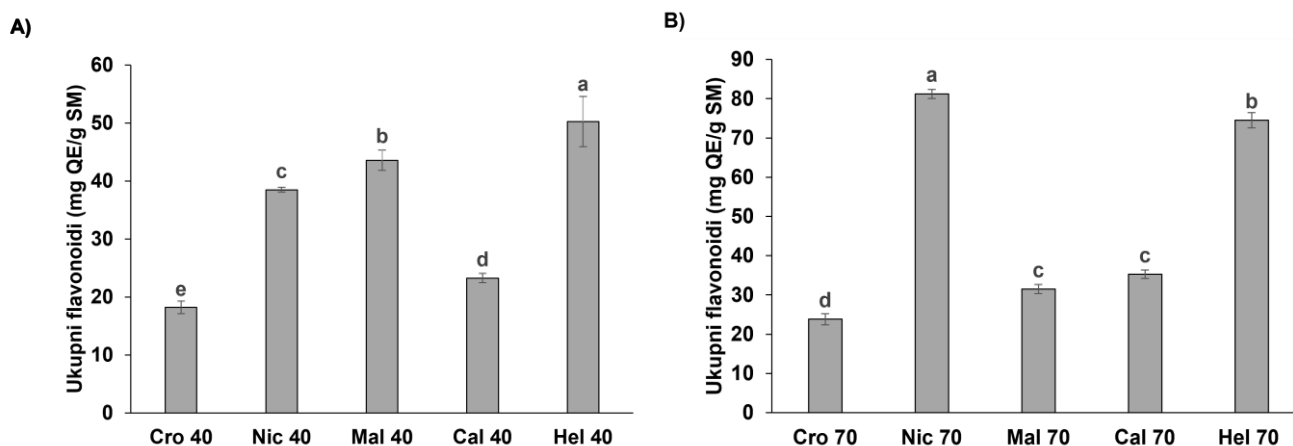
mg QE/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $13,94 \pm 0,75$ mg QE/g SM u 70%-tnom etanolu). 40%-tni etanolni ekstrakti šafrana i duhana bilježe statistički veće koncentracije ukupnih fenola od 40%-tnih etanolnih ekstrakata sljeza i suncokreta, dok ekstrakt nevena bilježi statistički značajno manje koncentracije fenola od svih drugih ekstrakata. 70%-tni etanolni ekstrakti šafrana, duhana i suncokreta bilježe statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenola od 70%-tnih etanolnih ekstrakata sljeza i nevena.



Slika 16. Udio ukupnih fenola ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

3.2. Ukupni flavonoidi

Rezultati na Slici 17. prikazuju koncentraciju ukupnih flavonoida u ekstraktima različitih cvjetnica u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izraženih u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM). Najveći udio zabilježen je u 40%-tnom etanolnom ekstraktu suncokreta ($43,58 \pm 4,35$ mg QE/g SM), odnosno u 70%-tnom etanolnom ekstraktu duhana ($81,23 \text{ mg} \pm 1,18$ QE/g SM), a najmanji u šafrana ($12,21 \pm 1,07$ mg QE/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $23,82 \pm 1,41$ mg QE/g SM u 70%-tnom etanolu). Svi 40%-tni etanolni ekstrakti bilježe statistički značajne razlike, dok su statistički veće koncentracije ukupnih flavonoida 70%-tnih etanolnih ekstrakata duhana i suncokreta, te ekstrakt šafrana bilježi statistički značajno manje koncentracije flavonoida od svih drugih ekstrakata.



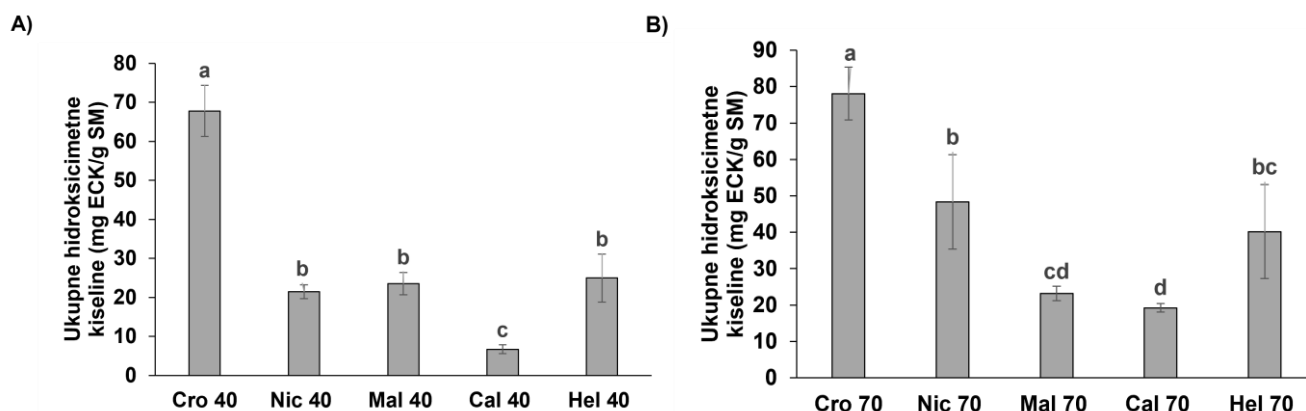
Slika 17. Udio ukupnih flavonoida ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

3.3. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli

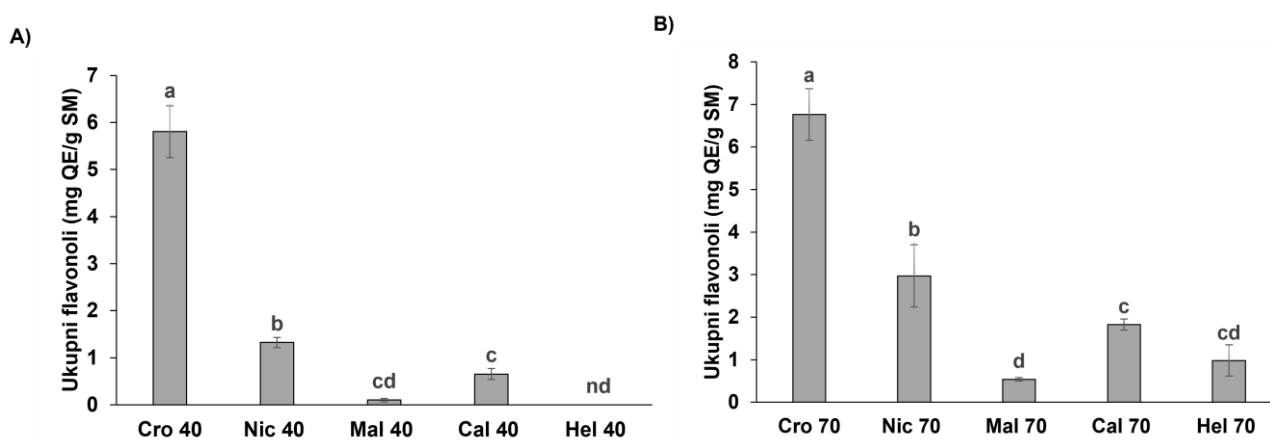
Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (Slika 18.) i flavonola (Slika 19.) određen je spektrofotometrijski pomoću modificirane metode prema Howard i sur. (2003). Najniži udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen je kod nevena u 40%-tnom i 70%-tnom etanolnom ekstraktu ($6,67 \pm 1,14$ mg ECK/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $19,23 \pm 1,12$ mg ECK/g SM u 70%-tnom etanolu), a najviši u šafrana u 40%-tnom i 70%-tnom etanolnom ekstraktu ($67,77 \pm 6,55$ mg ECK/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $78,07 \pm 7,24$ mg ECK/g SM u 70%-tnom etanolu). Kod ekstrakata u 40%-tnom etanolu došlo je do statistički značajne razlike šafrana i nevena u odnosu na ostale, dok kod ekstrakata u 70%-tnom etanolu statistički značajno veći udio hidroksicimetnih kiselina sadrži šafran, nakon toga slijede duhan i suncokret, zatim sljez i neven.

Najveći udio ukupnih flavonola izmjeren je kod šafrana u 40%-tnim i 70%-tnim etanolnim ekstraktima ($5,8 \pm 0,55$ mg QE/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $6,76 \pm 0,61$ mg QE/g SM u 70%-tnom etanolu). U 40%-tnom etanolnom ekstraktu suncokreta udio ukupnih flavonola bio je ispod razine detekcije, dok je u 70%-tnom etanolnom ekstraktu sljeza

zabilježeno $0,54 \pm 0,04$ mg QE/g SM. 40%-tni i 70%-tni etanolni ekstrakti šafrana i duhana sadrže statistički značajno više ukupnih flavonola od ostalih uzoraka.



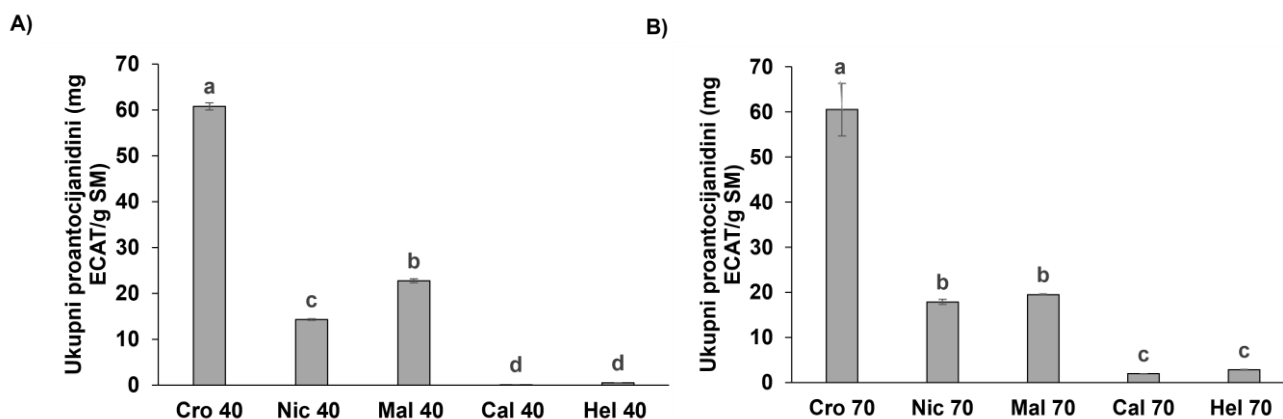
Slika 18. Udio ukupnih hidrokisicimnetnih kiselina ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta cimetine kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ECK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.



Slika 19. Udio ukupnih flavonola ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*, nd = ispod razine detekcije.

3.4. Ukupni proantocijanidini

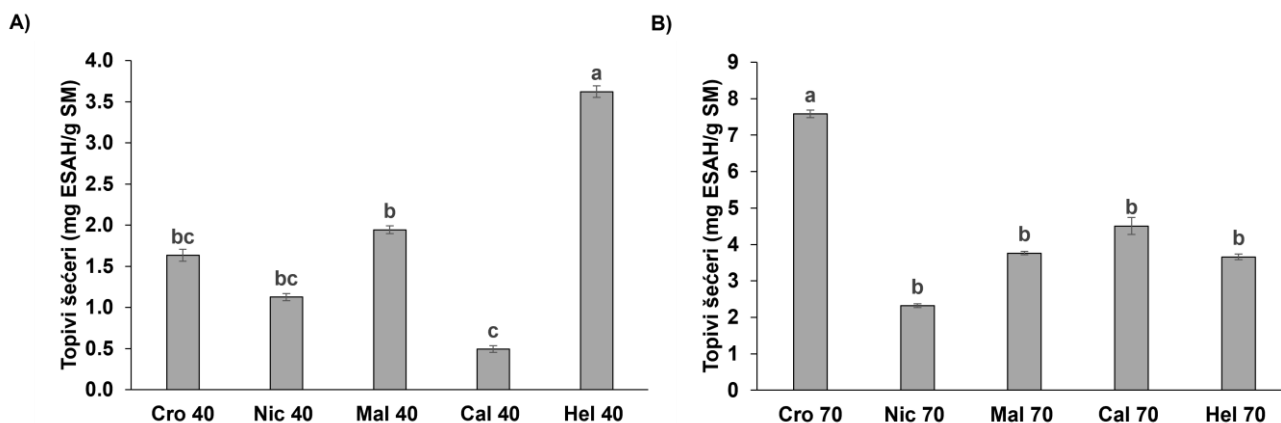
Udio ukupnih proantocijanidina sličan je kod 40%-tnih i 70%-tnih etanolnih ekstrakata analiziranih uzoraka. Tako ekstrakti nevena imaju najmanje proantocijanidina ($0,06 \pm 0,00$ mg ECAT/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $1,98 \pm 0,03$ mg ECAT/g SM u 70%-tnom etanolu) te se zajedno sa suncokretom statistički razlikuju od ostalih. Najviše proantocijanidina sadrže ekstrakti šafrana ($60,76 \pm 0,79$ mg ECAT/g SM u 40%-tnom etanolu, odnosno $60,54 \pm 5,82$ mg ECAT/g SM u 70%-tnom etanolu) (Slika 20.).



Slika 20. Udio ukupnih proantocijanidina cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta katehina po gramu suhe mase uzorka (mg ECAT/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

3.5. Topivi šećeri

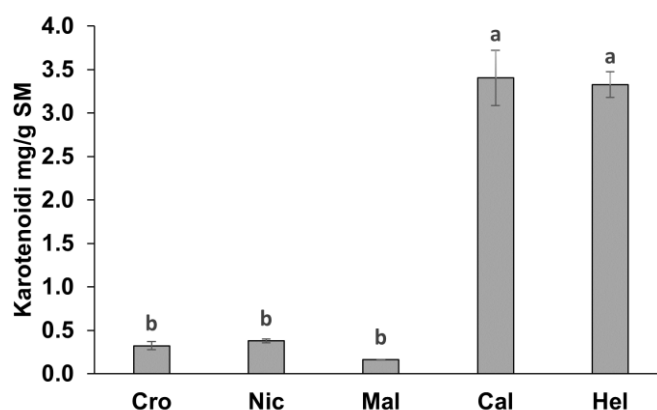
Slika 21. prikazuje udio topivih šećera u analiziranim uzorcima. 40%-tni etanolni ekstrakt suncokreta sadrži najviše topivih šećera ($3,62 \pm 0,07$ mg ESAH/g SM), a 40%-tni etanolni ekstrakt nevena najmanje ($0,73 \pm 0,04$ mg ESAH/g SM). 70%-tni etanolni ekstrakt šafrana statistički se značajno razlikuje od svih drugih ekstrakata i ima najveći udio topivih šećera ($7,54 \pm 0,10$ mg ESAH/g SM).



Slika 21. Udio ukupnih toplivih šećera cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izražen u miligramima ekvivalenta saharoze po gramu suhe mase uzorka (mg ESAH/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

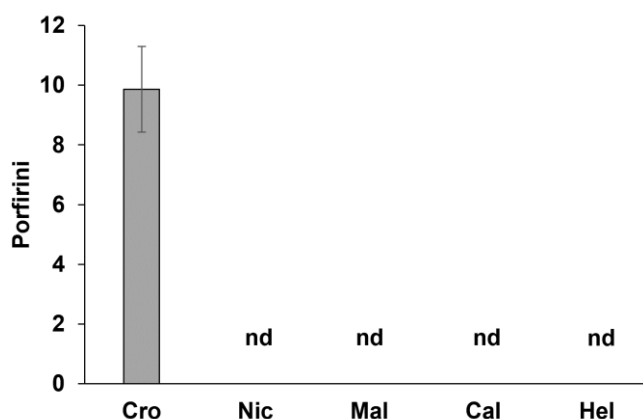
3.6. Karotenoidi i porfirini

Na Slici 22. prikazan je udio karotenoida različitih cvjetnica izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka. Zastupljenost karotenoida najveća je kod nevena ($3,40 \pm 0,32$ mg/g SM) i suncokreta ($3,33 \pm 0,15$ mg/g SM) i statistički se značajno razlikuje od ostalih biljaka koje imaju podjednako nisku koncentraciju karotenoida.



Slika 22. Udio ukupnih karotenoida odabranih cvjetnica izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

Porfirini su zabilježeni samo kod cvijeta šafrana te iznose $9,86 \pm 1,43$ mg/g SM (Slika 23.).

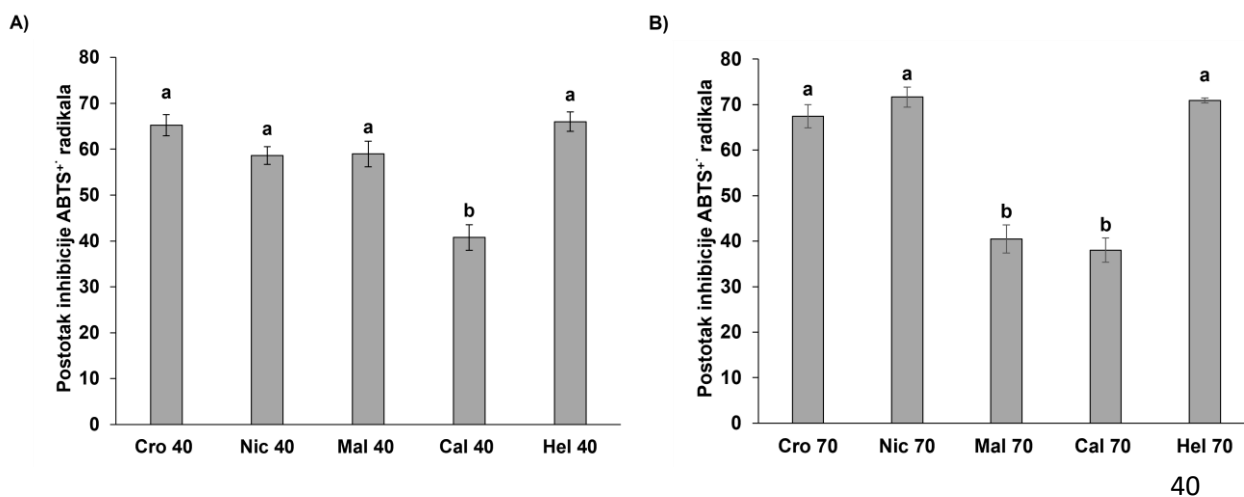


Slika 23. Udio ukupnih porfirina odabranih cvjetnica izražen u miligramima po gramu suhe mase uzorka (mg/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*, nd = ispod razine detekcije.

3.7. Antioksidacijski kapacitet odabranih cvjetnica

3.7.1. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

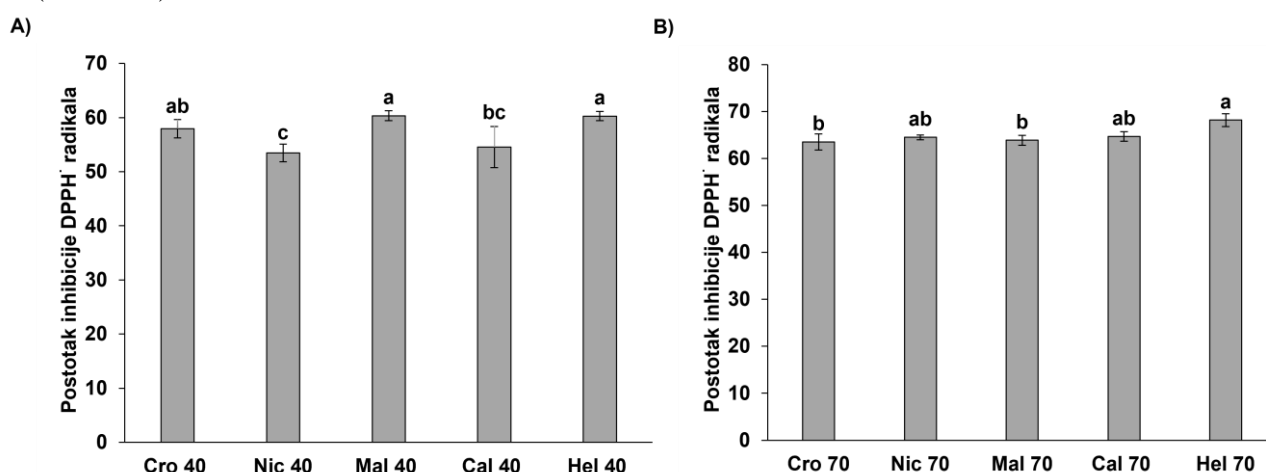
Najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod 40%-tnog etanolnog ekstrakta suncokreta ($66,00\% \pm 2,11$) i 70%-tnog etanolnog ekstrakta duhana ($71,68\% \pm 2,20$), dok je najmanji kapacitet kod nevena u oba tipa ekstrakta ($40,76\% \pm 2,80$ u 40%-tnom etanolu, odnosno $38,04\% \pm 2,68$ u 70%-tnom etanolu). 40%-tni etanolni ekstrakt nevena ima statistički značajno niži antioksidacijski kapacitet u usporedbi s ostalim uzorcima, dok kod ekstrakata u 70%-tnom etanolu sljez i neven imaju statistički niži kapacitet od ostala tri uzorka čiji kapacitet se statistički međusobno ne razlikuje (Slika 24.).



Slika 24. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izmjeren metodom ABTS i prikazan kao postotak inhibicije radikala ABTS⁺. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

3.7.2. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

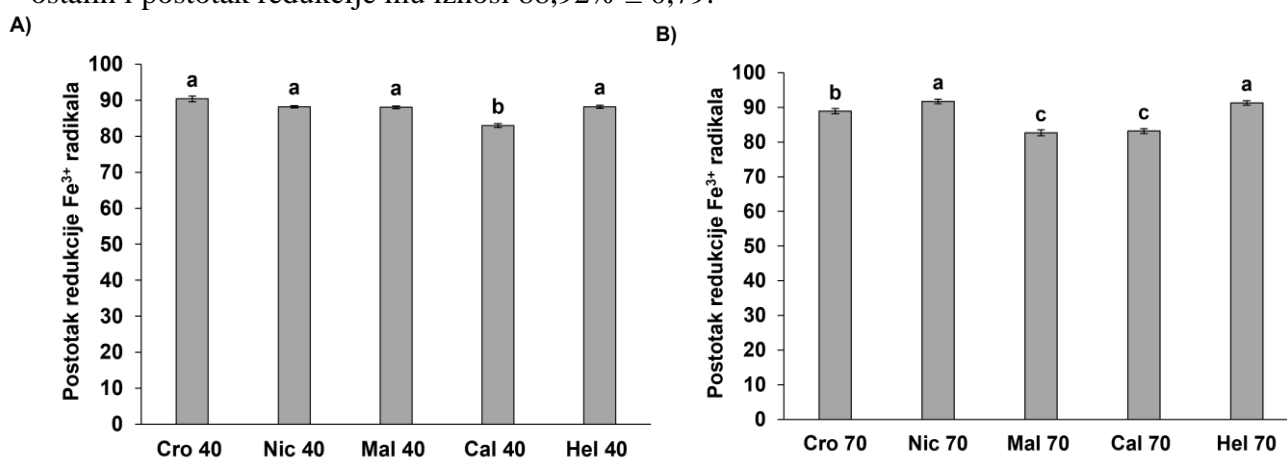
Rezultati dobiveni određivanjem antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH pokazuju da 40%-tni etanolni ekstrakti sljeza i suncokreta imaju statistički najviši kapacitet (60,34% ± 0,90 za sljez, odnosno 60,27% ± 0,86 za suncokret, a duhan najniži (53,45% ± 1,64). Među ekstraktima u 70%-tnom etanolu suncokret je pokazao najviši postotak inhibicije (67,30% ± 1,18), a šafran i sljez najniži (63,51% ± 1,71 za šafran, odnosno 63,85% ± 1,06 za sljez) (Slika 25.).



Slika 25. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izmjeren metodom DPPH i prikazan kao postotak inhibicije DPPH' radikala. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike ± standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

3.7.3. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

Rezultati analize antioksidacijskog kapaciteta određenog metodom FRAP (Slika 26.) pokazuju da je u slučaju ekstrakata u 40%-tnom etanolu postotak redukcije Fe^{3+} najniži kod nevena ($82,24\% \pm 0,49$) te se on statistički razlikuje od ostalih ekstrakata. Kod ekstrakata u 70%-tnom etanolu sljez i neven pripadaju jednoj statističkoj grupi i to onoj s najnižim vrijednostima redukcije ($82,67\% \pm 0,83$ za sljez, odnosno $83,16\% \pm 0,74$ za neven), ekstrakti duhana i suncokreta grupi s najvišim vrijednostima redukcije ($91,74\% \pm 0,62$ za duhan, odnosno $91,30\% \pm 0,64$ za suncokret), dok se ekstrakt šafrana statistički razlikuje od svih ostalih i postotak redukcije mu iznosi $88,92\% \pm 0,79$.



Slika 26. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvjetnica pripremljenih u A) 40%-tnom etanolu i B) 70%-tnom etanolu izmjeren metodom FRAP i prikazan kao postotak redukcije Fe^{3+} -TPTZ u Fe^{2+} -TPTZ kompleks. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna devijacija. Cro = *Crocus heuffelianus*, Nic = *Nicotiana tabacum*, Mal = *Malva sylvestris*, Cal = *Calendula officinalis*, Hel = *Helianthus annuus*.

4. RASPRAVA

Biljke su zauzele različite aspekte našega života, koristimo ih u kozmetici, medicini, koriste se kao začini i hrana, kao bojila i u industriji ulja. Industrijska je praksa upotrebljavati određeni dio biljke, dok se ostali dijelovi uglavnom zanemare i ne iskorištavaju. S ekološkog i ekonomskog aspekta, takav način „djelomičnog“ iskorištavanja biljaka nije održiv. Također, sve je veća svijest o važnosti zdrave prehrane te ljudi pokazuju sve veći interes za nutritivno bogatom, zdravom i raznolikom hranom. Najčešće se konzumiraju plodovi i listovi voća, povrća i aromatičnih vrsta, no zanemaren je unos biljnih vrsta kod kojih je jestiv cvat. Jestive cvjetne vrste poput nevena bogatog su nutritivnog sastava, posebice vitamina C, pigmenta te imaju snažno antioksidacijsko djelovanje (Mikuličin 2021). Također, kao primjer začina navela bih šafran, biljku poznatu kao najskuplji začim na svijetu, a sastoji se od dehidriranih njuški tučka (stigmi). Cvjetovi se beru ručno, a svaki cvijet ima tri stigme te je za 1 kg začina potrebno prikupiti oko 150 000 cvjetova šafrana (Fiore i sur. 2010). Šafran se već tisućljećima koristi kao začinska i ljekovita biljka, no u posljednje vrijeme pobuđuje sve veći interes znanstvenika. Ističe se potencijal šafrana u ublažavanju brojnih zdravstvenih tegoba, uključujući i bolesti koje danas na svjetskoj razini predstavljaju ozbiljne probleme. Latice šafrana glavni su nusproizvod berbe šafrana, a nisu korisne za poljoprivrednike (Goli i sur. 2012) Kako bi se smanjilo bacanje biljnog viška potrebno je dodatno istražiti tepale kao i ostale dijelove biljke šafrana. Biljka koja je najpoznatija kao izvor jestivih ulja iz sjemenki je svakako suncokret. Suncokret bi se mogao iskoristiti kao ekonomski vrlo prihvatljiva biljka s obzirom da se koristi u svrhu zelene stočne hrane za silažu. Cvjetovi suncokreta bez sjemenki mogu se koristiti kao jedini izvor krmiva u kompletnoj prehrani ovaca bez negativnih efekata (Gowd i sur. 1987). Također, suncokret se koristi za proizvodnju biodizela koji bi kao alternativni izvor energije u budućnosti trebao biti zastupljen sa oko 20% (Jocić i sur. 2006). Što se tiče duhana, dugi niz godina koristi se kao modelni organizam za istraživanja u biljnoj staničnoj biologiji, kulturi tkiva te molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu (Brar i sur. 1994, Flick i sur. 1984). Razlog tome je kratko generacijsko vrijeme, lagana transformacija i dostupnost biljke s obzirom da je to širom svijeta kultivirana biljka i jedna od komercijalno najcjenjenijih poljoprivrednih kultura u svijetu (Nasr i sur. 2014). Većina istraživanja usmjerila se na lišće vrste *Nicotiana tabacum*, a duhan je pravi primjer kako bi se trebala provesti istraživanja i na drugim dijelovima biljaka koji se inače odbacuju kao otpad jer su nedavna istraživanja pokazala kako odbačena stabljika također ima antioksidativna i antimikrobna djelovanja (Sharma i sur. 2016). Neven je pak vrsta poznata po svojim ljekovitim svojstvima, a stoljećima se uzgajao u ukrasnim vrtovima i kao lončanica (Efstratiou i sur. 2012). Ovo je vrsta čiji su cvjetovi uz lišće dosta istraživani jer su izvor

biološki aktivnih spojeva. Za razliku od nevena, šumski sljez je biljka čiji je fenolni sadržaj slabo istraživan te je njena upotreba na rubu nestanka (Novais i sur. 2004). S obzirom da se ova vrsta konzumira i cijenjena je zbog nutritivnih i ljekovitih sposobnosti za nekoliko tjelesnih sustava važno je proučiti fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet jestivih dijelova (lišća i stabljike) i nejestivih dijelova (cvijeće i sjeme) ove vrste (Beghdad i sur. 2014).

U ovom radu analizirala sam fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet dvaju tipova ekstrakata latica i tepala različitih cvjetnica, šafrana, šumskog sljeza, pravog duhana, jednogodišnjeg suncokreta i ljekovitog nevena. Ove vrste odabrala sam jer je biopotencijal njihovih latica i tepala slabo istražen i zanemaren. Rezultati su pokazali da ekstrakti tepala šafrana u oba tipa otapala sadrže značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i proantocijanidina (Slike 15, 16, 18, 19, 20) u odnosu na ostale analizirane uzorke. Također, jedino u uzorku šafrana zabilježila sam prisutnost porfirina. S druge strane, latice šafrana imale su najniži udio ukupnih flavonoida (Slika 17.). Prema istraživanju Mathew i sur. (2015) stigma šafrana posjeduje viši sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u usporedbi s tepalima, dok tepala nekih svojiti šafrana sadrže više ili slične koncentracije flavonoidnih glikozida od drugih ispitivanih organa (Šola i sur. 2018). Dominantni flavonoidi u domaćim svojtima roda *Crocus* su kempferol i kvercetin (Šola i sur. 2018). Goupy i sur. (2013) proučavanjem tepala šafrana identificirali su 19 flavonola. Kao glavni flavonol ističe se kempferol 3-*O*-soforozid kojeg se smatra glavnim flavonolom u sepalama sepalama i prašnicima šafrana.

Sljedeća cvjetnica koju sam analizirala je duhan (*Nicotiana tabacum*). Prema rezultatima u ovom radu to je druga po redu vrsta čije latice sadrže najviše ukupnih fenolnih spojeva, odmah iza tepala šafrana (Slike 15 i 16). Nadalje, 70%-tni etanolni ekstrakt duhana sadrži najviše ukupnih flavonoida u odnosu na ostale istraživane cvjetnice (Slika 17.). Chen i sur. (2012) istraživanjem 70%-tnog metanolnog ekstrakta listova vrste *Nicotiana tabacum* identificirali su 14 fenola uključujući kvercetin, rutin, kempferol-3-*O*-rutinozid, klorogensku, kumarinsku, kavenu i feruličnu kiselinu. Nasr i sur. (2014) detektirali su flavonoide samo u stabljikama biljke duhana, u korijenu ne. Također, mlade biljke imale su više koncentracije flavonoida od odraslih. Rutin i kempferol bili su prevladavajući flavonoidi koji se nalaze u tkivima duhana, ali u manjim koncentracijama od hidroksicinamoilkvininske kiseline koja je također identificirana. Sličan rezultat zabilježila sam i ja u sklopu svog rada, latice duhana imale su više vrijednosti hidroksicimetnih kiselina, izraženih u miligramima ekvivalenata

cimetne kiseline po gramu, nego flavonola izraženih u miligramima ekvivalenata kvercetina po gramu (Slike 18 i 19).

Latice šumskog sljeza (*Malva sylvestris*) sadrže niže udjele ukupnih fenolnih spojeva i flavonola od tepala šafrana i latica duhana (Slike 15, 16, i 19). Barros i sur. (2010) proučavali su udjele spojeva u metanolnim ekstraktima različitih organa vrste *Malva neglecta*. Najveći udio fenolnih spojeva, flavonoida i karotenoida pronađen je u listovima sljeza što objašnjava njegova terapijska svojstva, a fenolni spojevi identificirani u ekstraktima bili su kininska i jabučna kiselina, kavena, kumarinska, benzojeva i salicilna kiselina (Barros i sur. 2010).

Latice suncokreta (*Helianthus annuus*) izdvojile su se kod ekstrakata ukupnih flavonoida u 40%-tnom etanolu, imale su najveći udio. Zanimljivo je da flavonoli u ovom uzorku uopće nisu detektirani, što znači da su očito dominantno zastupljene neke druge skupine flavonoida. Ovaj ekstrakt imao je i najveći udio topivih šećera (Slika 21.) te, uz neven, najveći udio ukupnih karotenoida (Slika 22.). Ye i sur. (2015) istraživali su udio ukupnih fenola u suncokretovim cvjetovima u različitim tipovima ekstrakata. Tako je najveći udio fenola zabilježen u ekstraktu sa 90%-tnim metanolom. Među nekoliko fenolnih spojeva u ekstraktima cvjetova izokvercitrin je bio jedini flavonoid, ostalo su bile fenolne kiseline i njihovi derivati poput klorogenske, kavene, *p*-kumarinske kiseline (Ye i sur. 2015). U istraživanju Liang i sur. (2013), u ekstraktima cvjetova suncokreta, glavni fenolni spojevi bili su derivati hidroksicimetnih kiselina, a Kamal (2011) je svojim istraživanjem utvrdio da je količina ukupnih flavonoida bila najveća u listovima, zatim korijenu pa stabljici suncokreta. Vrlo sličan rezultat sam zabilježila i ja u ovom radu, latice suncokreta imale su više hidroksicimetnih kiselina nego flavonola (Slike 18 i 19). Gai i sur. (2020) istraživali su metanolne ekstrakte jednogodišnjeg suncokreta. Sakupljene biljke u sredini cvatnje bile su bogatije fenolnim spojevima od onih koje su sakupljane u ranijoj i kasnijoj fazi rasta. Glavni fenolni spojevi određeni u tom istraživanju bile su mono- i dikafeoilkininska kiseline (Gai 2020).

Calendula officinalis je važna vrsta iz roda *Calendula* te je poznata po svojim ljekovitim svojstvima (Ak i sur. 2020). Prema istraživanju Ak i sur. (2020) u etanolnim ekstraktima cvjeta nevena ukupni sadržaj fenola bio je najveći, a zatim u ekstraktima listova i korijena. Također, metanolni ekstrakt cvijeta nevena imao je veći sadržaj fenola i flavonoida u usporedbi s metanolnim ekstraktom lista nevena. Što se tiče ukupnog sadržaja flavonoida, najviši je zabilježen u ekstraktima listova, zatim u ekstraktima cvijeta i korijena (Ak i sur. 2020). Cruceriu i sur. (2020) u metanolnim ekstraktima cvijeta nevena identificirali su 14 različitih fenolnih spojeva, dok su ih u metanolnom ekstraktu lista pronašli 12. Metanolni

ekstrakti cvijeta i lista nevena odlikuju se prisutnošću flavonola, i to kvercetina i derivata izoramnetina. U analiziranim ekstraktima također su prisutni, u većim količinama u ekstraktima cvijeta, fenolne kiseline poput hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te kumarini (Cruceriu i sur. 2020). U hidroalkoholnim ekstraktima cvjetova nevena kvantificirani flavonoidi bili su procijanidin i kvercetin-3-rutinozid (Escher i sur. 2019), a u vodenim i metanolnim ekstraktima nevena pronađeni su kempferol, kvercetin i rutin (Ćetković i sur. 2004).

Tanini su spojevi koji imaju sposobnost vezanja proteina te sudjeluju u zaštiti od bakterijskih i gljivičnih infekcija (Kraus i sur. 2013). Istraživanja su pokazala da tanini posjeduju antioksidativno, antikancerogeno i antimikrobno djelovanje (Kazeem i sur. 2014). Na količinu tanina u biljkama utječu okolišni čimbenici poput suše, pH vrijednosti, koncentracije ozona i CO₂. U ovom radu istraženi su udjeli kondenziranih tanina, odnosno proantocijanidina u laticama i tepalima odabranih cvjetnica. Najviše proantocijanidina sadrže etanolni ekstrakti šafrana, a najmanje etanolni ekstrakti latica nevena (Slika 20.).

Malo istraživanja je provedeno o koncentraciji topivih šećera u laticama i tepalima šafrana, duhana, šumskog sljeza, ljekovitog nevena i suncokreta. Analiza 40%-tnih i 70%-tnih etanolnih ekstrakata ukazala je na značajne razlike u udjelu topivih šećera pojedinog uzorka. Upotrebom 40%-tnog etanola laticice suncokreta sadržavale su najveći udio šećera, no upotrebom 70%-tnog etanola najviše šećera zabilježeno je u uzorku tepala šafrana (Slika 21.). Ovakav rezultat ukazuje koliko je značajan odabir otapala kod ekstrakcije topivih šećera iz biljnih uzoraka. *Malva sylvestris* sadrži fruktozu, glukozu, saharozu i rafinozu kao glavne šećere.

Pigmenti karotenoidi zaduženi su za apsorpciju svjetlosti. Karotenoidi i klorofil *b* predstavljaju pomoćne pigmente koji proširuju spektar apsorpcije klorofila *a*, odnosno proširuju spektar apsorpcije svjetlosti koja sudjeluje u procesu fotosinteze (Lazarević i Poljak 2019). Karotenoidi daju laticama žute, narančaste i crvene boje. Poznati su kao vrlo učinkoviti fizički i kemijski gasitelji singletnog kisika kao i snažni čistači ROS-ova (Bukhari i sur. 2018). U svom radu zabilježila sam značajno veći udio karotenoida kod ekstrakata latica nevena i suncokreta čije su laticice žute i narančaste boje (Slika 22.). Liakopolou-Kyriakides i Kyriakidis (2002) izvjestili su o prisutnosti velikog broja karotenoidnih spojeva u ekstraktima šafrana poput krocina, krocetina, α -karotena, likopena, zeaksantina. Pikrokrocini i safranal dvije su glavne fitokemikalije šafrana odgovorne za gorki okus i miris, a nastaju oksidacijom karotenoida (Mykhailenko i sur. 2019). U istraživanjima nevena, Escher i sur. (2019) najveći sadržaj β -karotena uočili su u ekstraktima sa 100%-tnim etanolom, a u ekstraktima sa 50%-

tnim i 75%-tnim etanolom nisu uočene razlike. Cvjetovi nevena osim β -karotena sadrže i α -karoten, γ -karoten, lutein, flavoksantin, rubiksantin i druge karotenoide (Escher i sur. 2019).

Reaktivne kisikove vrste (ROS) jaka su oksidacijska sredstva te su uzrok oksidacijskih oštećenja biomolekula poput lipida i proteina, što na kraju rezultira smrću stanice (Anjum i sur. 2013). U idealnim uvjetima bez stresa antioksidacijski sustav štiti stanicu od ROS-ova koji nastaju, no u češćim stresnim uvjetima kao što su nepovoljna temperatura, povišeni salinitet ili suša, ravnoteža između oksidansa i antioksidansa je narušena te djeluje antioksidacijski obrambeni sustav (Mittler 2002). U svrhu istraživanja potrebno je kombinirati laboratorijske metode koje se koriste za procjenu antioksidacijskog potencijala jer različiti antioksidansi koji djeluju u različitim mehanizmima doprinose antioksidacijskom potencijalu biljke. U ovom radu antioksidacijski potencijal latica i tepala odabranih cvjetnica izmjerila sam korištenjem tri metode – ABTS, DPPH i FRAP. Sve tri metode temelje se na prijenosu elektrona, no metode ABTS i DPPH uključuju slobodne radikale ($\text{ABTS}^{\cdot+}$ i DPPH^{\cdot}), a FRAP podrazumijeva redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} . Metoda ABTS ukazala je da svi uzorci u 40%-tnom etanolu imaju sličan, i vrlo dobar, antioksidacijski kapacitet, izuzev uzorka latica nevena koji je pokazao značajnu nižu vrijednost (Slika 24.). U sve tri korištene metode u ekstraktima s 40%-tnim etanolom laticе suncokreta i sljeza imale su najviše vrijednosti antioksidacijskog djelovanja, dok su u ekstraktima sa 70%-tnim etanolom laticе suncokreta bile najučinkovitije. Na temelju ovoga zaključujem da su laticе suncokreta i sljeza bogatije antioksidansima od ostalih uzoraka.

5. ZAKLJUČAK

Svijest o važnosti zdrave prehrane nikad nije bila veća, ljudi pokazuju sve veći interes za nutritivno bogatom, zdravom i raznolikom hranom. Najčešće se konzumiraju plodovi i listovi voća, povrća i aromatičnih vrsta, no zanemaren je unos biljnih vrsta kod kojih je jestiv cvat. U ovom radu analizirala sam fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet ekstrakata latica i tepala različitih cvjetnica, šafrana, šumskog sljeza, pravog duhana, suncokreta i nevena u 40%-tnom i 70%-tnom etanolu. Ove vrste odabrala sam jer je biopotencijal njihovih latica i tepala slabo istražen i zanemaren, a s obzirom da ih je lako uzgojiti i široko su rasprostranjene u našim krajevima, u slučaju pozitivnih rezultata, moglo bi ga se intenzivnije iskorištavati u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. U sklopu ovog rada primijetila sam da ekstrakti tepala šafrana u oba tipa otapala sadrže značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva, hidrosicimetnih kiselina, flavonola i proantocijanidina u odnosu na ostale analizirane uzorke. Također, jedino u uzorku šafrana zabilježila sam prisutnost porfirina. Latice duhana izdvojile su se kod ekstrakata ukupnih flavonoida u 70%-tnom etanolu, a suncokreta kod ekstrakata ukupnih flavonoida u 40%-tnom etanolu, imale su najveći udio. Flavonoli u ovom uzorku uopće nisu detektirani, što znači da su dominantno zastupljene neke druge skupine flavonoida. Najviše proantocijanidina sadržavali su etanolni ekstrakti šafrana, a najmanje etanolni ekstrakti latica nevena. Koncentracija upotrebljenog otapala značajno je utjecala na udio ekstrahiranih šećera iz različitih uzoraka; upotrebom 40%-tnog etanola najveći udio šećera ekstrahiran je iz latica suncokreta, dok je upotrebom 70%-tnog etanola najviše šećera ekstrahirano iz tepala šafrana. Značajno veći udio karotenoida zabilježila sam kod ekstrakata latica nevena i suncokreta nego kod ostalih uzoraka. U sve tri korištene metode mjerenja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima s 40%-tnim etanolom latice suncokreta i sljeza imale su najviše vrijednosti antioksidacijskog djelovanja, dok su u ekstraktima sa 70%-tnim etanolom latice suncokreta bile najučinkovitije. Na temelju ovoga zaključujem da su latice suncokreta i sljeza bogatije antioksidansima od ostalih uzoraka.

6. LITERATURA

Abdullaev F.I., Espinosa-Aguirre J.J. (2004): Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention* 28: 426-432.

Abebe T., Guenzi A.C., Martin B., Cushman J.C. (2003): Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131: 1748-1755.

Adler L.S., Irwin R.E. (2012): What you smell is more important than what you see? Natural selection on floral scent. *New Phytologist* 195: 510-511.

Ak G., Zengin G., Sinan K.I., Mahomoodally M.F., Picot-Allain M.C.N., Cakir O., Bensari S., Yilmaz M.A., Gallo M., Montesano D. (2020): A comparative bio-evaluation and chemical profiles of *Calendula officinalis* L. extracts prepared via different extraction techniques. *Applied Sciences* 5920: 1-16.

Alagawany M., Farag M.R., El-Hack M.E.A., Dhama K. (2015): The practical application of sunflower meal in poultry nutrition. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3: 634-648.

Al-Lahham S., Sbieh R., Jaradat N., Almasri M., Mosa A., Hamayel A., Hammad F. (2020): Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of *Nicotiana tabacum* L. *European Journal of Integrative Medicine* 33: 1-6.

Al-Shukaili N.B.M.B.A., Hossain M.A. (2019): Antimicrobial and cytotoxic potential of seeds and flowers crude extracts of sunflower. *Grain & Oil Science and Technology* 2: 103-108.

Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T. (2013): Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sunflower (*Helianthus annuus*) seed extract. *Phytochemistry Letters* 6: 302-305.

Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013): Silver nanoparticles in soil–plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* 15: 1-26.

Auwärter W., Écija D., Klappenberger F., Barth J. V. (2015): Porphyrins at interfaces. *Nature Chemistry* 7: 105–120.

Barros L., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R. (2010): Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1466-1472.

Bartley G. E., Scolnik P. A. (1995): Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027-1038.

Basch E., Bent S., Foppa I., Haskmi S., Kroll D., Mele M., Szapary P., Ulbricht C., Vora M., Yong S. (2006): Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 6: 135-159.

Beecher G. R. (2010): Proanthocyanidins. U: Coates P. M. (ur.) *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Boca Raton, Informa Healthcare, str. 555-568.

- Beghdad M.C., Benammar C., Bensalah F., Sabri F.Z., Belarbi M., Chemat F. (2014): Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris* L.) from North Western of Algeria. African. Journal of Biotechnology 13: 486-491.
- Benzie F.I., Strain J.J. (1999): Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power of ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 299: 15-27.
- Bester D., Esterhuysen A.J., Truter E.J., Rooyen J. (2010): Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. Nutrition Research Reviews 23: 334-348.
- Bhalodia N. R., Nariya P. B., Acharya R. N., Shukla V. J. (2013): *In vitro* antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda 34: 209-14.
- Bhandari P.R. (2014): *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. Journal of Traditional and Complementary Medicine 5: 81-87.
- Boskabady M.H., Farkhondeh T. (2016): Antiinflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Crocus sativus* L. and its main constituents. Phytotherapy Research 30: 1072-1094.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews 56: 317-333.
- Brar D.S., Khush G.S. (1994): Cell and tissue culture for plant improvement. U: Basra A.S. (ur.) Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. New York, Mercel Dekker Inc, str. 229-278.
- Bukhari S.I., Manzoor M., Dhar M.K. (2018): A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. Biomedicine & Pharmacotherapy 98: 733-745.
- Butnariu M., Coradini C.Z. (2012): Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. Chemistry Central Journal 6: 1-7.
- Caballero-Ortega H., Pereda-Miranda R., Abdullaev F.I. (2007): HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. Food Chemistry 100: 1126-1131.
- Camejo-Rodrigues J., Ascensao L., Angels Bonet M., Valles J. (2003): An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). Journal of Ethnopharmacology 89: 199-209.

- Caretto S., Nisi R., Paradiso A., De Gara L. (2010): Tocopherol production in plant cell cultures. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 726-730.
- Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* 16: 251-280.
- Chen Y., Li X., Yang G., Chen Z., Hu Q., Miao M. (2012): Phenolic compounds from *Nicotiana tabacum* and their biological activities. *Journal of Asian Natural Products Research* 14: 450-456.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani A. (2006): Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 449-459.
- Cruceriu D., Diaconeasa Z., Socaci S., Socaciu C., Rakosy-Tican E., Balacescu O. (2020): Biochemical profile, selective cytotoxicity and molecular effects of *Calendula officinalis* extracts on breast cancer cell lines. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 48: 24-39.
- Ćetković G.S., Djilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M., Tumbas V.T. (2004): Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International* 37: 643-650.
- Dai J., Mumper R.J. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352
- Delgado-Vargas F., Jiménez A. R., Paredes-López O. (2000): Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 173-289.
- Dimitrijević A., Imerovski I., Miladinović D., Cvejić S., Jocić S., Zeremski T., Sakač Z. (2017): Oleic acid variation and marker-assisted detection of pervenets mutation in high- and low-oleic sunflower cross. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 17: 235-241.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Efstratiou E., Hussain A.I., Nigam P.S., Moore J.E., Ayub M.A., Rao J.R. (2012): Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 18: 173-176.
- Eldahshan O. A., Singab A. N. B. (2013): Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2: 225-234.
- Escher G.B., Borges L., Santos J.S., Cruz T.M., Marques M.B., Carmo M.A.V., Azevedo L., Furtado M.M., Sant'Ana A.S., Wen M., Zhang L., Granato D. (2019): From the field to the pot: phytochemical and functional analyses of *Calendula officinalis* L. flower for incorporation in an organic yogurt. *Antioxidants* 8: 559-582.

- Fiore A, Pizzichini D, Diretto G, Scossa F, Spanò L. (2010): Genomics and transcriptomics of saffron: new tools to unravel the secrets of an attractive spice. *Functional Plant Science Biotechnology* 4: 25-30.
- Fisk I.D., White D.A., Carvalho A., Gray D.A. (2006): Tocopherol – an intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 341-344.
- Flick C.E., Evans D.A. (1984): Tobacco. U: Sharp W.R., Evans D.A., Ammirato P.V., Yamada Y. (ur.) *Hand book of plant cell culture*. London, Collier Macmillan Publishers, str. 606-630.
- Furlan C. M., Motta L. B, Cursino dos Santos D. Y. A. (2011): Tannins: what do they represent in plant life? U: Petridis G. K. (ur.) *Tannins: types, foods containing and nutrition*. Hauppauge, Nova Science Publishers, str. 251-263.
- Gai F., Karamać M., Janiak M.A., Amarowicz R., Peiretti P.G. (2020): Sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants at various growth stages subjected to extraction – comparison of the antioxidant activity and phenolic profile. *Antioxidants* 9: 1-13.
- Goli S.A.H., Mokhtari F., Rahimmalek M. (2012): Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) petal. *Journal of Agricultural Science* 4: 175-181
- Gowd, B. C. S., Reddy, M. R., Reddy, G. V. N. (1987): Utilization of sunflower heads as roughage source in complete feeds for sheep. *Indian Journal of Animal Nutrition* 4: 28-33.
- Goupy P., Vian M.A., Chemat F., Caris-Veyrat C. (2013): Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products* 44: 496-510.
- Gutiérrez-Grijalva E. P., Picos-Salas M. A., Leyva-López N., Criollo-Mendoza M. S., Vazquez-Olivo G., Heredia J. B. (2018): Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants* 7: 2-23.
- Hartmann T. (2007): From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831–2846.
- He F., Pan Q., Shi Y., Duan C. (2008): Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules* 13: 2674-2703.
- Hosseinzadeh H., Younesi H.M. (2002): Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology* 2: 2-7.
- Howard L. R., Clar 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: 1238-1247.
- Hussein R. A., El-Anssary A. A. (2018): Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. U: Builders P. F. (ur.) *Herbal Medicine*. London, IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/61866> (pristupljeno 14.05.2022.).

- Jiang N., Doseff A. I., Grotewold E. (2016): Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants* 5: 1-27.
- Jocić, S., Škorić, D., Lečić, N., Sakač, Z. (2006): Mogućnost stvaranja hibrida suncokreta s različitom kvalitetom ulja. Zbornik radova sa 47. Savetovanje, Proizvodnja i prerada uljarica, Herceg Novi, str. 9-19.
- Kabera J. N., Semana E., Mussa A. R., He X. (2014): Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2: 377-392.
- Kamal J. (2011): Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology* 10: 3149-3151.
- Kaminski K.P., Bovet L., Laparra H., Lang G., De Palo D., Sierro N., Goepfert S., Ivanov N.V. (2020): Alkaloid chemophenetics and transcriptomics of the *Nicotiana* genus. *Phytochemistry* 177: 112424.
- Karamać M., Kosinska A., Estrella I., Hernandez T., Duenas M. (2012): Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. *European Food Research and Technology* 235: 221-230.
- Kazeem M., Ogungbe S.M., Saibu G., Aboyade O. (2014): *In vitro* study on the hypoglycemic potential of *Nicotiana tabacum* leaf extracts. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 9: 140-145.
- Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A. (2005): Analysis of carotenoid composition in petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 2122-2128.
- Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opleta L. (2008): Condensed and hydrolysable tannins as antioxidant influencing the health. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 8: 436-447.
- Kraus T. E. C., Dahlgren R. A., Zasoski R. J. (2003): Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil* 256: 41-66.
- Kumar G., Kadam G.B., Saha T.N., Girish K.S., Tiwari A.K., Kumar R. (2014): Studies on floral biology of *Malva sylvestris* L. *Indian Journal of Horticulture*. 71: 295-297.
- Lage M., Cantrell C.L. (2009): Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae* 121: 366-373.
- Larkin R. M. (2016): Tetrapyrrole signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1586.
- Lazarević B., Poljak M. (2019): Fiziologija bilja. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb.

- Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A. (2002): *Crocus sativus* – biological active constituents. *Studies in Natural Products Chemistry* 26: 293-309.
- Liang Q., Cui J., Li H., Liu J., Zhao G. (2013): Florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.): potential new sources of dietary fiber and phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3435-3442.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118-126.
- Luka C.D., Tijjani H., Joel E.B., Ezejiofor U.L., Onwukike P. (2013): Hypoglycaemic properties of aqueous extracts of *Anacardium occidentale*, *Moringa oleifera*, *Vernonia amygdalina* and *Helianthus annuus*: a comparative study on some biochemical parameters in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 7: 16-22.
- Mageney V., Neugart S., Albach D. C. (2017): A guide to the variability of flavonoids in *Brassica oleracea*. *Molecule* 22: 252-268.
- Maness N. (2010): Extraction and analysis of soluble carbohydrates. U: Sunkar R. (ur.) *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology* 639. Totowa, Humana Press, str. 341-370.
- Marmesat S., Morales A., Velasco J., Dobarganes M.C. (2012): Influence of fatty acid composition on chemical changes in blends of sunflower oils during thermoxidation and frying. *Food Chemistry* 135: 2333-2339.
- Mathew S., Abraham T.E., Zakaria Z.A. (2015): Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under *in vitro* conditions. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 5790–5798.
- Mikuličin V. (2021): Nutritivni potencijal i sadržaj specijaliziranih metabolita jestivih vrsta cvijeća. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Milović M. (2016): Rod *Crocus* L. (Iridaceae) u flori Hrvatske. *Glasnik Hrvatskog botaničkog društva* 2: 4-20 (pristupljeno 15.09.2022.).
- Mishra A.K., Mishra A., Pragma, Chattopadhyay P. (2018): Screening of acute and sub-chronic dermal toxicity of *Calendula officinalis* L. essential oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 98: 184-189.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mohammadkhani N., Heidari R. (2008): Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal* 3: 448-453.
- Muley B.P, Khadabadi S.S., Banarase N.B. (2009): Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8: 455-465.

- Mykhailenko O., Kovalyov V., Goryacha O., Ivanauskas L. (2019): Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry* 162: 56-89.
- Nasr S.B., Aazza S., Mnif W., Miguel M. (2014): Phenol content and antioxidant activity of different young and adult plant parts of tobacco from Tunisia, dried at 40 and 70°C. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4: 023-031.
- Nikolić T. (2017): Cvijet. U: Nikolić T. (ur.) Morfologija biljaka-razvoj, građa i uloga biljnih tkiva, organa i organskih sustava. Zagreb, Alfa d.d., str. 253-274.
- Nix A., Paull C., Colgrave M. (2017): Flavonoid profile of the cotton plant, *Gossypium hirsutum*. *Plants* 6: 1-14.
- Norbaek R., Brandt K., Nielsen J.K., Orgaard M., Jacobsen N. (2002): Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 763-791.
- Novais M.H., Santos I., Mendes S., Pinto-Gomes C. (2004): Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93: 183-195.
- Ough C. S., Amerine M. A. (1988): Phenolic compounds. U: Ough C. S. i Amerine M. A. (ur.) Methods for analysis of musts and wines. New York, Jon Wiley & Sons Inc., str. 203-221.
- Paolini J., Barboni T., Desjobert J., Djabou N., Muselli A., Costa J. (2010): Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 865-874.
- Peiretti P.G., Meineri G. (2010): Evolution of chemical composition nutritive value and fatty acid content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) during the growth cycle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 112-117.
- Pintea A., Bele C., Andrei S., Socaciu C. (2003): HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* 47: 37-40.
- Pires T.C.S.P., Dias M.I., ferrL., Ferreira I.C.F.R. (2017): Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients. *Food Chemistry* 220: 337-343.
- Pisoschi A. M., Pop A., Cimpeanu C., Predoi G. (2016): Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1-36.
- Preethi K.C., Kuttan R. (2009): Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. *Journal of Basic & Clinical & Physiology & Pharmacology* 20: 73-79.
- Premkumar K., Thirunavukkarasu C., Abraham S.K., Santhuya S.T., Ramesh A. (2006): Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agent sin mice. *Human & Experimental Toxicology* 25: 79-84.

Quave Q.L., Pieroni A., Bennett B.C. (2008): Dermatological remedies in the traditional pharmacopoeia of Vulture-Alto Bradano, inland southern Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 4: 1-10.

Radić Brkanac S., Gerić M., Gajski G., Vujčić V., Garaj-Vrhovac V., Kremer D., Domijan A. M. (2015): Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 73: 923-929.

Rashid U., Anwar F., Arif M. (2009): Optimization of base catalytic methanolysis of sunflower (*Helianthus annuus*) seed oil for biodiesel production by using response surface methodology. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48: 1719-1726.

Rauf S., Jamil N., Tariq S.A., Khan M., Kausar M., Kaya Y. (2017): Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97: 1997-2006.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.

Reis Giada M. L. (2013): Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. U: Morales-Gonzales J. A. (ur.) *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants*. London, IntechOpen, str. 87-112.

Rios J.L., Recio M.C., Giner R.M., Manez S. (1996): An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 10: 189-193.

Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González J. A., Hilal M., Prado F. E. (2009): Soluble sugars - metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior* 4: 388–393.

Ru Q., Wang L., Li W., Wang J., Ding Y. (2012): *In Vitro* antioxidant properties of flavonoids and polysaccharides extract from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Molecules* 17: 11281-1129.

Saitoh F., Noma M., Kawashima N. (1985): The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry* 24: 477-480.

Samarghandian S., Borji A. (2014): Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Research* 6: 99-107.

Sánchez-Vioque R., Rodríguez-Conde M.F., Reina-Urena J.V., Escolano-Tercero M.A., Herraiz-Penalver D., Santana-Méridas O. (2012): In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products* 39: 149-153.

Senge M.O., Sergeeva N.N., Hale K.J. (2021): Classic highlights in porphyrin and porphyrinoid total synthesis and biosynthesis. *Chemical Society Reviews* 50: 4730-4789.

- Sharma Y., Dua D., Nagar A., Srivastava N.S. (2016): Antibacterial activity, phytochemical screening and antioxidant activity of stem of *Nicotiana tabacum*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 7: 1156-1167.
- Sindhu C.G. (2010): Phytochemical screening of *Calendula officinalis* Linn leaf extract by TLC. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy 1: 131-134.
- Slavov A., Ognyanov M., Vasileva I. (2020): Pectic polysaccharides extracted from pot marigold (*Calendula officinalis*) industrial waste. Food Hydrocolloids 101: 1-40.
- Sumanta N., Haque C. I., Nishika J., Suprakash R. (2014): Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. Research Journal of Chemical Sciences 4: 63-69.
- Šola I., Stipaničev M., Vujčić V., Mitić B., Huđek A., Rusak G. (2018); Comparative analysis of native *Crocus* taxa as a great source of flavonoids with high antioxidant activity. Plant Food for Human Nutrition 73: 189-195.
- Šola I., Vujčić Bok V., Dujmović M., Rusak G. (2020): Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. Journal of Food Science and Technology 57: 702–712.
- Talhout R., Schulz T., Florek E., Benthem J., Wester P., Opperhuizen A. (2011): Hazardous compounds in tobacco smoke. International Journal of Environmental Research and Public Health 8: 613-628.
- Tanaka T., Matsui Y., Kouno I. (2009): Chemistry of secondary polyphenols produced during processing of tea and selected foods. International Journal of Molecular Sciences 11: 14-40.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal 54: 733–74.
- Taofiq O., González-Paramás A. M., Filomena Barreiro M., Ferreira I. C. (2017): Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives. Molecules 22: 281-305.
- Tarantilis P.A., Polissiou M.G. (1997): Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 459-462.
- Tarantilis P.A., Tsoupras G., Polissiou M. (1995): Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. Journal of Chromatography 699: 107-118.
- Vidal-Ollivier E., Elias R., Faure F., Babadjamian A., Crespin F., Balansard G., Boudon G. (1989): Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. Planta Medica 55: 73-74.
- Vijender K., Bhat Z.A., Dinesh K., Shah M.Y., Chashoo I.A., Khan N.A. (2011): Physicochemical and preliminary phytochemical studies on petals of *Crocus sativus* 'Cashmerianus'. Pharmacognosy Journal 3: 46-49.

Weidner S., Karolak M., Karamać M., Kosínska A., Amarowicz R. (2009): Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 78: 97-103.

Wessinger C.A., Rausher M.D. (2012): Lessons from flower colour evolution on targets of selection. *Journal of Experimental Botany* 63: 5741-5749.

Whitney H.M., Bennett K.M.V., Dorling M., Sandbach L., Prince D., Chittka L., Glover B.J. (2011): Why do so many petals have conical epidermal cells? *Annals of Botany* 108: 609-616.

Wong M.C.S., Lao X.Q., Ho K., Goggins W.B., Tse S.L.A. (2017): Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific Reports* 7: 14300-14309.

Ye F., Liang Q., Li H., Zhao G. (2015): Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidant activity of extracts from florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Industrial Crops and Products* 76: 574-581.

Zhao D., Tao J., Han C., Ge J. (2012): Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Molecular Biology Reports* 39: 11263-11275.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Journal of Food Chemistry* 64: 555-559.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. svibnja 1996. u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam u OŠ „Grgur Karlovčan“ u Đurđevcu 2011. godine. Iste godine upisala sam Opću gimnaziju Dr. Ivana Kranjčeva Đurđevac. Nakon završetka gimnazije, 2015. godine sam upisala Preddiplomski studij biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Zvanje Sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.) stekla sam 2018. godine predajom završnog rada naslovljenog „Ljekovite biljke na Đurđevačkim pijescima“. Iste godine sam upisala Diplomski studij eksperimentalne biologije, modul Botanika. Stručnu praksu odradila sam u herbarijskoj zbirci „Herbarium Croaticum“ na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje sam provodila digitalizaciju istoimene herbarijske zbirke. Tijekom studija sudjelovala sudjelovala sam na projektu Biolog-i-Ja te u Udruzi studenata biologije – BIUS, prvotno kao članica, a kasnije kao suvoditeljica Sekcije za ljekovito bilje. Kao pasivni sudionik bila sam na Petom simpoziju studenata bioloških usmjerenja - SiSB5 2019. godine, a iste godine radila sam kao volonterka u Nacionalnom parku Sjeverni Velebit kao njegovateljica planinskog bilja. Sa sekcijom za ljekovito bilje 2019. godine provela sam kartiranje flore otoka Zlarina u sklopu BIUS-ovog projekta istraživanja bioraznolikosti otoka, a rezultate istraživanja prezentirali smo na Šestom Hrvatskom botaničkom simpoziju u Zagrebu (Vizec, P., Šegota, V., Vuković, N., Bučar, M., Justić, M., Vukres, A., Valjak, N., Levačić, D., Flanjak, L., Matijević, V., Dragun, D. (2019): Floristic mapping of the island of Zlarin (Northern Dalmatia). U: Jasprica, N., Car, A. (ur.) Book of Abstracts XXXIV Sixth Croatian Botanical Symposium with International Participation. Zagreb, Croatian Botanical Society, str. 32-32). Drugo florističko istraživanje provela sam u sklopu kolegija Flora Hrvatske zajedno s kolegama. Rezultate tog istraživanja prezentirale smo posterom na Šestom Hrvatskom botaničkom simpoziju u Zagrebu, a rad je publiciran početkom 2021. godine (Justić, M., Bučar, M., Vizec, P., Vukres, A., Šegota, V. (2020): Vascular flora of Jelenovac Forest Park (Zagreb, Croatia). Prihvaćen za objavljivanje u Glasnik Hrvatskog botaničkog društva. [Preprint]). Također, koautorica sam i jednog kratkog priopćenja (Justić, M., Bučar, M., Vizec, P., Vukres, A., Šegota, V., Vuković, N. (2020): Rare and endangered orchid *Cypripedium calceolus* L. refound in Gorski Kotar (W Croatia) after 126 years. *Natura Croatica : periodicum Musei historiae naturalis Croatici*, 29 (1), 55-62).